

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE  
PROF. DR. MATTHIAS EVERT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**QUANTITATIVE METHYLIERUNGSANALYSEN DER GENE  
MGMT, RASSF1A, RASAL1, PDCD4, MTSS1 UND TUSC3 AM  
BRONCHIALKARZINOM**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Uta Katharina Duppel

2016



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE  
PROF. DR. MATTHIAS EVERT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**QUANTITATIVE METHYLIERUNGSANALYSEN DER GENE  
MGMT, RASSF1A, RASAL1, PDCD4, MTSS1 UND TUSC3 AM  
BRONCHIALKARZINOM**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Uta Katharina Duppel

2016

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Wolfgang Dietmaier
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Christian Schulz
Tag der mündlichen Prüfung:	24. Mai 2017

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>6</b>
1.1 Epidemiologie .....	6
1.2 Risikofaktoren und Pathogenese des Lungenkarzinoms .....	6
1.3 Methylierung von Promotorregionen .....	8
1.4 Untersuchte Gene .....	10
1.4.1 O6-Methylguanine-DNA-Methyltransferase (MGMT) .....	10
1.4.2 Ras-Association-Domain-Family-Protein-1 (RASSF1A).....	10
1.4.3 Ras-Protein-Activator-Like-Protein-1 (RASAL1).....	11
1.4.4 Programmed-Cell-Death-4 (PDCD4) .....	12
1.4.5 Metastasis-Suppressor-1 (MTSS1).....	14
1.4.6 Tumor-Suppressor-Candidate-3 (TUSC3).....	15
1.5 Zielsetzung .....	16
<b>2 Patientengut.....</b>	<b>17</b>
2.1 Patientengewebe.....	17
2.2 Patientendaten .....	17
2.2.1 Klinische Daten .....	17
2.2.2 Pathologische Daten .....	18
<b>3 Materialien .....</b>	<b>19</b>
3.1 Chemikalien .....	19
3.2 Geräte .....	19
3.3 Verbrauchsmaterialien .....	20
3.4 Software .....	20
<b>4 Methoden .....</b>	<b>22</b>
4.1 Isolierung von DNA aus Patientengewebe.....	22
4.1.1 Mikrodissektion .....	22
4.1.2 DNA-Isolierung mittels MagNA Pure LC.....	22
4.2 Konzentrationsbestimmung und Aufkonzentrierung von DNA .....	23
4.2.1 Vermessung von DNA.....	23
4.2.2 Aufkonzentrierung von DNA .....	23
4.3 Quantitative Methylierungsanalyse.....	24
4.3.1 Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen .....	25
4.3.2 Primerdesign .....	26
4.3.3 Oligonukleotide .....	26
4.3.4 Charakterisierung des Amplifizierungssegments .....	26
4.3.5 Real-time PCR am LightCycler 1.0.....	27
4.3.6 Real-time PCR am LightCycler® 480.....	28
4.3.7 Standardkurve am LightCycler® 480.....	29
4.4 Statistische Auswertung .....	29
<b>5 Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
5.1 Patientengut.....	30
5.1.1 Klinische Daten .....	30
5.1.2 Pathologische Daten .....	31
5.2 Methylierungsstatus .....	34
5.2.1 Auswahl der Gene .....	34
5.2.2 Festlegung des Cut-off-Werts.....	34
5.2.3 Methylierung im Bronchus-, Lungen- und Tumorgewebe .....	35

5.3	Korrelation des Methylierungsstatus mit klinischen und pathologischen Parametern .....	39
5.3.1	Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Geschlecht .....	39
5.3.2	Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Alter .....	40
5.3.3	Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Überleben .....	41
5.3.4	Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Nikotinabusus .....	42
5.3.5	Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Primärtumor T .....	42
5.3.6	Korrelation zwischen Methylierungsstatus und N-Stadium .....	45
5.3.7	Korrelation zwischen Methylierungsstatus und M-Stadium .....	46
5.3.8	Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Grading .....	47
5.3.9	Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Residualtumor .....	48
5.3.10	Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Histologie .....	49
5.3.11	Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Stadiengruppierung .....	50
5.4	Überlebensfunktionen nach Kaplan-Meier .....	52
5.4.1	Überleben in Abhängigkeit vom Alter zum Diagnosezeitpunkt .....	53
5.4.2	Überleben in Abhängigkeit vom Tumorstadium T, detailliert .....	54
5.4.3	Überleben in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall .....	55
5.4.4	Überleben in Abhängigkeit von der Fernmetastasierung .....	56
5.4.5	Überleben in Abhängigkeit vom Erkrankungsstadium .....	57
5.4.6	Überleben in Abhängigkeit vom Residualtumor .....	59
5.4.7	Überleben in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus von TUSC3 im Tumorgewebe .....	60
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>61</b>
6.1	Unterschiede in der Methylierungshäufigkeit zwischen Lungen- und Bronchusgewebe .....	61
6.2	Untersuchte Gene .....	61
6.2.1	O6-Methylguanine-DNA-Methyltransferase (MGMT).....	61
6.2.2	Ras-Association-Domain-Family-Protein-1 (RASSF1A) .....	70
6.2.3	Ras-Protein-Activator-Like-Protein-1 (RASAL1) .....	75
6.2.4	Programmed-Cell-Death-4 (PDCD4) .....	78
6.2.5	Metastasis-Suppressor-1 (MTSS1).....	83
6.2.6	Tumor-Suppressor-Candidate-3 (TUSC3) .....	87
6.3	CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) .....	95
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>99</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>102</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>108</b>
<b>11</b>	<b>Eigene Publikation.....</b>	
<b>12</b>	<b>Danksagung.....</b>	
<b>13</b>	<b>Erklärung .....</b>	

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 5.1	Verteilung der Methylierungswerte in Prozent von TUSC3 im Bronchialgewebe .....	36
Abbildung 5.2	Verteilung der Methylierungswerte in Prozent von TUSC3 im Lungengewebe .....	36
Abbildung 5.3	Verteilung der Methylierungswerte in Prozent von TUSC3 im Tumorgewebe .....	37
Abbildung 5.4	Überleben in Abhängigkeit vom Alter bei Diagnose .....	53
Abbildung 5.5	Überleben in Abhängigkeit vom Primärtumor T, detailliert.....	54
Abbildung 5.6	Überleben in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall .....	55
Abbildung 5.7	Überleben in Abhängigkeit von der Fernmetastasierung .....	56
Abbildung 5.8	Überleben in Abhängigkeit von der Stadiengruppierung, einfach .....	57
Abbildung 5.9	Überleben in Abhängigkeit von der Stadiengruppierung, detailliert .....	58
Abbildung 5.10	Überleben in Abhängigkeit vom Residualtumor .....	59
Abbildung 5.11	Überleben in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus von TUSC3 im Tumorgewebe .....	60

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Anzahl der pro Gen untersuchten Gewebe.....	17
Tabelle 4.1	Als Positiv-Kontrolle verwendete Zelllinien .....	25
Tabelle 4.2	Charakterisierung des Amplifizierungssegments .....	27
Tabelle 4.3	Temperaturen und Zeiten während der Amplifizierung am LightCylcer 1.0.....	27
Tabelle 4.4	Temperaturen und Zeiten während der Amplifizierung bei TUSC3 am LightCycler® 480	28
Tabelle 5.1	Zusammenfassung der klinischen Daten.....	30
Tabelle 5.2	Verteilung der histologischen Tumortypen unter den Patienten dieser Arbeit .....	31
Tabelle 5.3	Verteilung des T-Stadiums (Primärtumor) nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation von 2010, einfach.....	32
Tabelle 5.4	Verteilung des T-Stadiums (Primärtumor) nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation von 2010, detailliert .....	32
Tabelle 5.5	Verteilung des Lymphknotenstatus N nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation von 2010 .....	32
Tabelle 5.6	Verteilung der Fernmetastasen M nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation von 2010	33
Tabelle 5.7	Verteilung des histopathologischen Gradings nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation von 2010 .....	33
Tabelle 5.8	Verteilung des Residualtumorstadiums nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation von 2010 .....	33
Tabelle 5.9	Stadienverteilung nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation von 2010, einfach .....	33
Tabelle 5.10	Stadienverteilung nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation von 2010, detailliert .....	34
Tabelle 5.11	Methylierung von Bronchus-, Lungen- und Tumorgewebe .....	35
Tabelle 5.12	Methylierungsstatus und Geschlecht .....	39
Tabelle 5.13	Methylierungsstatus und Alter .....	40
Tabelle 5.14	Methylierungsstatus und Überleben.....	41
Tabelle 5.15	Methylierungsstatus und Nikotinabusus .....	42
Tabelle 5.16	Methylierungsstatus und Primärtumor T, einfach.....	43
Tabelle 5.17	Methylierungsstatus und Primärtumor T, detailliert .....	44
Tabelle 5.18	Methylierungsstatus und N-Stadium.....	45
Tabelle 5.19	Methylierungsstatus und Fernmetastasierung .....	46
Tabelle 5.20	Methylierungsstatus und Grading .....	47
Tabelle 5.21	Methylierungsstatus und Residualtumor.....	48
Tabelle 5.22	Methylierungsstatus und Histologie.....	49
Tabelle 5.23	Methylierungsstatus und Stadiengruppierung, einfach .....	50
Tabelle 5.24	Methylierungsstatus und Stadiengruppierung, detailliert.....	51
Tabelle 5.25	Überleben in Abhängigkeit vom Alter bei Diagnose .....	53
Tabelle 5.26	Überleben in Abhängigkeit vom Primärtumor T, detailliert .....	54
Tabelle 5.27	Überleben in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall.....	55
Tabelle 5.28	Überleben in Abhängigkeit von der Fernmetastasierung .....	56
Tabelle 5.29	Überleben in Abhängigkeit von der Stadiengruppierung, einfach .....	57



Tabelle 5.30	Überleben in Abhängigkeit von der Stadiengruppierung, detailliert .....	58
Tabelle 5.31	Überleben in Abhängigkeit vom Residualtumor .....	59
Tabelle 5.32	Überleben in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus von TUSC3 im Tumorgewebe .....	60
Tabelle 6.1	Methylierungsergebnisse für MGMT in NSCLC-Primärtumoren und dazugehörigem Normalgewebe in verschiedenen Studien .....	63
Tabelle 6.2	Methylierungsergebnisse für RASSF1A im Primärtumor und dazugehörigem Normalgewebe in verschiedenen Studien .....	72
Tabelle 9.1	TNM-Klassifikation der Karzinome der Lunge: aus Wittekind, C.; Meyer, H.-J.; „TNM- Klassifikation maligner Tumoren“, 7. Auflage; Wiley-Blackwell, Weinheim, 2010.....	102
Tabelle 9.2	Histopathologisches Grading: aus Wittekind, C.; Meyer, H.-J.; „TNM-Klassifikation maligner Tumoren“, 7. Auflage; Wiley-Blackwell, Weinheim, 2010.....	103
Tabelle 9.3	Stadiengruppierung: aus Wittekind, C.; Meyer, H.-J.; „TNM-Klassifikation maligner Tumoren“, 7. Auflage; Wiley-Blackwell, Weinheim, 2010.....	103
Tabelle 9.4	Relative Methylierungsstärke in Prozent von MGMT in Bronchus, Lunge und Tumor bei Patienten mit positivem Methylierungsstatus .....	104
Tabelle 9.5	Relative Methylierungsstärke in Prozent von RASSF1A in Bronchus, Lunge und Tumor bei Patienten mit positivem Methylierungsstatus .....	104
Tabelle 9.6	Relative Methylierungsstärke in Prozent von RASAL1 in Bronchus, Lunge und Tumor bei Patienten mit positivem Methylierungsstatus .....	105
Tabelle 9.7	Relative Methylierungsstärke in Prozent von TUSC3 in Bronchus, Lunge und Tumor bei Patienten mit positivem Methylierungsstatus .....	106
Tabelle 9.8	Relative Methylierungsstärke in Prozent bei Patienten mit positivem Methylierungsstatus mehrerer Gene .....	107

# **1 Einleitung**

## **1.1 Epidemiologie**

Beim Lungenkarzinom handelt es sich weltweit nach wie vor um das Krebsleiden mit der höchsten Inzidenz und Mortalität. Schätzungen zufolge erkrankten 2012 über 1,82 Millionen Menschen an diesem Malignom, womit es bei Männern an erster und bei Frauen an dritter Stelle aller Krebsneuerkrankungen steht. Es forderte zugleich mit 1,59 Millionen Menschen die meisten krebsbedingten Todesopfer (GLOBOCAN 2012 v1.2).

In Deutschland lag das Lungenkarzinom im Jahr 2010 bei Männern an zweiter und bei Frauen an dritter Position der Krebsinzidenz und stellte die häufigste beziehungsweise zweithäufigste krebsbedingte Todesursache dar. Dies entspricht relativen Fünfjahresüberlebensraten von 16 Prozent bei Männern und 21 Prozent bei Frauen. Während bei Männern die altersstandartisierte Erkrankungs- und Sterberate seit Ende des letzten Jahrtausends um etwa 20 Prozent zurückging, stieg sie bei Frauen seither um circa 30 Prozent an. Hierfür wird vor allem der gestiegene Nikotinkonsum unter Frauen verantwortlich gemacht (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., 2013).

## **1.2 Risikofaktoren und Pathogenese des Lungenkarzinoms**

Lungenkarzinome stellen eine heterogene Gruppe von Tumoren dar, die sich sowohl hinsichtlich ihrer Lokalisation innerhalb der Lunge als auch ihrer Histologie unterscheiden (Auerbach et al., 1991). So werden kleinzellige (SCLC) von nicht-kleinzelligen Karzinomen (NSCLC), die sich wiederum in Plattenepitel-, Adeno- und großzellige Karzinome sowie ihre Subtypen unterteilen, abgegrenzt (Übersicht in: Travis 2004; Übersicht in: Junker 2006).

Ihre Entstehung wird durch eine Reihe von Faktoren begünstigt, wobei dem Nikotinkonsum sowohl in aktiver als auch passiver Form für die Allgemeinbevölkerung sicherlich die größte Bedeutung zukommt. 80 bis 85 Prozent, bisweilen sogar bis zu 90 Prozent aller malignen Lungentumore werden mit dem Genuss von Tabak in Verbindung gebracht (Übersicht in: IARC, 2004; Parkin et al., 2011). Vor allem die eher zentral in der Lunge gelegenen kleinzelligen und Plattenepithelkarzinome treten in der Regel bei Rauchern und Männern auf, wohingegen die meist peripher lokalisierten Adenokarzinome gehäuft bei Nichtrauchern und Frauen zu finden sind (Auerbach et al., 1991; Toh et al., 2006). Aber

auch Asbest (Doll, 1955; De Matteis et al., 2012), Arsen (Übersicht in: Salnikow et al., 2008) und Chromate (Gibb et al., 2000; Übersicht in: Salnikow et al., 2008; Ali et al., 2011), Nickel- (Übersicht in: Salnikow et al., 2008; De Matteis et al., 2012) und Siliziumstäube (De Matteis et al., 2012), insbesondere in Form von Cristobalit (Bugge et al., 2012), häusliche (Darby et al., 2005: Metaanalyse) und berufliche Radonbelastung (Lubin et al., 1995: Metaanalyse) sowie Feinstaubexposition (Raaschou-Nielsen et al., 2013) und Infektionen mit Humanen Papillomviren (Cheng et al., 2001) tragen beispielsweise zu der Entstehung dieser Erkrankung bei. In Entwicklungs- und Schwellenländern dürfen Luftschadstoffe wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und Benzo(a)pyrene, die durch unvollständige Verbrennung von Kohle beim Kochen und Heizen entstehen, ätiologisch nicht unberücksichtigt bleiben (Mumford et al., 1995; Kleinerman et al., 2002; Sapkota et al., 2008). All diese und weitere Faktoren können letztlich zu molekularen Schäden in der Lunge und damit zur malignen Entartung führen.

Mittlerweile wurde eine Vielzahl von genetischen und epigenetischen Veränderungen bei Bronchialkarzinomen identifiziert, die ihren Beitrag zu deren Entstehung leisten und sich durchaus je nach histologischem Subtyp oder in Abhängigkeit von klinischen Parametern wie dem Raucherstatus unterscheiden können (Sato et al., 1994; Wistuba et al., 2000a; Wistuba et al., 2000b; Shigematsu et al., 2005b; Übersicht in: Risch et al., 2008). Wie auch andere Malignome scheint sich das invasive Bronchialkarzinom über mehrere Vorstufen aus normalem Epithel zu entwickeln (Sacomanno et al., 1974; Thiberville et al., 1995). Dabei lassen sich bereits in nicht-neoplastisch-alteriertem Gewebe molekulare Veränderungen als pathogenetisches Korrelat finden, die mit fortschreitender maligner Transformation zunehmen (Wistuba et al., 1999a; Wistuba et al., 2000a). Darunter fallen Mutationen (Miller et al., 1992), Loss of Heterozygosity (Miller et al., 1992; Hung et al., 1995; Mao et al., 1997; Wistuba et al., 2000b), Mikrosatelliteninstabilität (Park et al., 1999), Genamplifizierungen- und -verluste (Jiang et al., 2004), Histonmodifikationen (Übersicht in: Risch et al., 2008) sowie Promotorhypo- (Nelson et al., 2012) und -hypermethylierungen (Guo et al., 2004). Hierdurch kommt es zu Störungen in Signalkaskaden und Veränderungen von Zellfunktionen sowie zur Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, was die Dysregulation von Proliferation und Apoptose, aber auch verstärkte Angiogenese und Epithelial-to-Mesenchymal-Transition (EMT) zur Folge haben kann (Übersicht in: Herbst et al., 2008). Veränderungen auf den kurzen Armen von Chromosom 3 (Hung et al., 1995; Thiberville et al., 1995; Wistuba et al., 1997; Wistuba et al., 2000a; Übersicht in: Herbst et al., 2008) und 9 (Thiberville et al., 1995; Wistuba et al.,

1997) sollen beispielsweise mit zu den ersten Ereignissen in der Pathogenese des Lungenkarzinoms gehören. Relativ charakteristisch für das Adenokarzinom sind unter anderem Her-2- (Shigematsu et al., 2005a; Buttitta et al., 2006), KRAS- (Riely et al., 2008), ALK- (Shaw et al., 2009) und EGFR-Veränderungen. Letztere betreffen in erster Linie Nichtraucher und Frauen (Pao et al., 2004; Shigematsu et al., 2005b; Suzuki et al., 2006) und sind mit einer erhöhten Sensitivität der Tumoren gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren wie Erlotinib oder Gefitinib assoziiert (Pao et al., 2004). Allerdings wurden mittlerweile Resistenzen gegen diese Therapeutika beobachtet (Pao et al., 2005; Bean et al., 2008), weshalb neuere Generationen dieser Kinaseinhibitoren getestet werden (Somasundaram et al., 2014: Metaanalyse). Translokationen des ALK-Gens finden sich vor allem bei jüngeren männlichen Patienten ohne ausgeprägten Nikotinkonsum, die an einem metastasierten Adenokarzinom beziehungsweise an Tumoren mit Siegelringhistologie erkrankt sind (Shaw et al., 2009). Inzwischen wurde eine Reihe von ALK-Inhibitoren entwickelt, wobei sich auch hier eine Resistenzentwicklung zeigt (Somasundaram et al., 2014: Metaanalyse). Der ALK-Inhibitor Crizotinib scheint dabei auch bei Tumoren mit ROS1-Veränderungen wirksam zu sein (Bergethon et al., 2012). Gene wie LKB1 werden sowohl mit dem Adenokarzinom als auch dem Plattenepithelkarzinom in Verbindung gebracht (Ji et al., 2007), wohingegen beispielsweise das Tp53-Gen sowohl beim nicht-kleinzelligen als auch beim kleinzelligen Bronchialkarzinom betroffen ist (Miller et al., 1992; Suzuki et al., 1992). Neben den hier nur exemplarisch genannten genetischen Veränderungen wird aber auch epigenetischen Alterationen, insbesondere Methylierungen von Promotorregionen, eine immer größere Bedeutung für die Karzinogenese zuteil (Guo et al., 2004; Suzuki et al., 2006; Tessema et al., 2014). Zusätzlich spielen erhöhte Wachstums- und Angiogenese-Faktorspiegel für die Karzinomentstehung und -progression eine Rolle (Han et al., 2001; Kuhn et al., 2004). Letztlich trägt die sich ständig erweiternde Kenntnis dieser molekularen Mechanismen durchaus zu einer besseren Einschätzung der Prognose des Patienten bei und ermöglicht zudem die Entwicklung und Verbesserung therapeutischer Optionen, auch im Sinne einer personalisierten Medizin, sowie eine genauere Vorhersage des Therapieerfolges (Übersicht in: Herbst et al., 2008; Übersicht in: Rosell et al., 2013).

### **1.3 Methylierung von Promotorregionen**

Neben Mutationen, die direkt die Abfolge der Basensequenz betreffen, können auch epigenetische Phänomene, worunter man beispielsweise kovalente Modifikationen von Histonproteinen und anderen Chromatinbestandteilen, Nukleosomen-Remodelling sowie DNA-

Methylierungen versteht, die Aktivität und Funktion von Genen beeinflussen und dadurch an der Entstehung und Progression von Tumoren beteiligt sein. Diese epigenetischen Veränderungen werden ebenso wie genetische Alterationen an Tochterzellen weitergegeben (Übersicht in: Jones and Baylin, 2007).

Methylierungen werden durch DNA-Methyltransferasen verursacht, die Methylreste auf Cytosin übertragen, wodurch 5-Methylcytosin entsteht. Dabei kommt es regelhaft nur zur Modifikation von Cytosinen, auf die ein Guanin folgt. Im menschlichen Genom liegen CpG-Dinukleotide zumeist methyliert vor. Diese sind jedoch unterrepräsentiert, was durch die spontane Desaminierung von 5-Methylcytosin zu Thymin erklärt werden kann. Eine Ausnahme bilden jedoch Promotorregionen, in deren Bereich CpG-Gruppen gehäuft und in nicht-methylierter Form zu finden sind und dadurch in gewisser Weise konserviert werden. Man spricht auch von CpG-Inseln (Coulondre et al., 1978; Rideout et al., 1990; Übersicht in: Herman et al., 2003; Übersicht in: Egger et al., 2004; Übersicht in: Illingworth et al., 2009). Sind Promotorregionen methyliert, kann dies die Expression des dazugehörigen Gens verhindern (Myöhänen et al., 1998; Übersicht in: Bird et al., 1999; Übersicht in: Herman et al., 2003; Übersicht in: Illingworth et al., 2009). Dieser Mechanismus spielt physiologischerweise zum Beispiel beim Imprinting von Genen (Sapienza et al., 1987; Li et al., 1993) und der Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms (Sharp et al., 2011) eine Rolle. Gleichzeitig kann aber auch die abnorme Methylierung von Promotorregionen zur Karzinogenese beitragen (Übersicht in: Jones and Baylin, 2007). Toyota et al. prägten 1999 den Begriff „CpG island methylator phenotype (CIMP)“, nachdem sie bei kolorektalen Karzinomen eine Reihe von Genen identifiziert hatten, die bei einem Teil der Tumoren gleichzeitig methyliert waren, jedoch nicht bei den übrigen Karzinomen oder in gesundem Gewebe. Daraus folgerten sie, dass dieser Phänotyp zur Tumorentstehung beitragen kann.

Auch beim Lungenkarzinom wurden inzwischen Methylierungen vieler Gene – teilweise auch in frühen Stadien der Karzinogenese (Belinsky et al., 1998; Licchesi et al., 2008) – nachgewiesen (Feng et al., 2008; Castro et al., 2010; Nelson et al., 2012). Bisweilen wird auch vermutet, dass mit zunehmender Methylierung von Genen im Sputum das Risiko, an diesem Malignom zu erkranken, steigt (Belinsky et al., 1998; Belinsky et al., 2005; Belinsky et al., 2006; Leng et al., 2012). Doch auch in der bronchioalveolären Lavage (Kim et al., 2004) und im Blut (Russo et al., 2005; Begum et al., 2011) von Lungenkarzinompatienten fanden sich diese Veränderungen. Somit könnte die Kenntnis des Methylierungsstatus verschiedener Gene sowohl bei der Vorhersage des Erkrankungsrisikos, der Früherkennung dieser Tumore als auch der Einschätzung der Prognose der Patienten hilfreich

sein. Dabei besteht der Verdacht, dass der Konsum von Nikotin (Kubo et al., 2009; Yang et al., 2011), aber auch die Exposition gegenüber Chromstäuben (Ali et al., 2011), Arsen und Nickel (Übersicht in: Salnikow et al., 2008) sowie Emissionen, die bei der Verbrennung von Kohle entstehen (Liu, Y. et al., 2008), an der Entstehung von Methylierungen beteiligt sind. Mitunter wird auch beim Lungenkarzinom die Existenz eines „CpG island methylator phenotype“ diskutiert, wobei diesem keine einheitliche Definition zugrunde liegt (Suzuki et al., 2006; Liu, Z. et al., 2008).

## 1.4 Untersuchte Gene

Insgesamt wurden sechs Gene, denen eine tumorsupprimierende Funktion zugeschrieben wird, in dieser Arbeit auf ihren Methylierungsstatus hin untersucht.

### 1.4.1 O6-Methylguanine-DNA-Methyltransferase (MGMT)

Das O6-Methylguanine-DNA-Methyltransferase-Gen (MGMT) liegt auf Chromosom 10q26 (Natarajan et al., 1992) und kodiert für ein DNA-Reparatur-Protein, das durch alkylierende Substanzen verursachte Methylierungen und Alkylierungen von Guanin entfernt, indem es die Alkylgruppe auf einen Cysteinrest überträgt und dadurch selbst irreversibel inaktiviert wird (Olsson and Lindahl, 1980: *E. coli*; Bogden et al., 1981: *Maus*; Lindahl, 1981: *E. coli*; Pegg et al., 1982: *Mensch*; Tano et al., 1990: *Mensch*). Es handelt sich hierbei um einen Reparaturmechanismus, der – wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung (Grafstrom et al., 1984) – in zahlreichen Organismen zu finden ist (Bogden et al., 1981: *Maus*; Rydberg et al., 1990: *E. coli*, *B. subtilis*, *Rind*, *Mensch*; Tano et al., 1990: *Mensch*). Zudem unterscheidet sich die Aktivität dieses Proteins in verschiedenen Geweben und bei einzelnen Individuen, wobei die Aktivität in der Leber am stärksten, im Gehirn am schwächsten ausgeprägt ist. In der Lunge liegt ein mittleres Aktivitätsniveau vor (Grafstrom et al., 1984).

### 1.4.2 Ras-Association-Domain-Family-Protein-1 (RASSF1A)

Das Ras-Association-Domain-Family-Protein-1-Gen (RASSF1) befindet sich auf Chromosom 3p21.3 (Lerman et al., 2000) und kodiert für ein Genprodukt, das in insgesamt sieben verschiedenen Varianten A bis G vorliegt, die durch alternatives Splicing sowie unterschiedliche Verwendung von Promotoren entstehen (Übersicht in: Agathangelou et al., 2005). Die hier untersuchte Variante RASSF1A scheint auf verschiedene Arten regulativ in

den Zellzyklus einzugreifen. Zum einen hemmt es die für die Zellprogression notwendige Akkumulation von Cyclin D1 am Übergang der G<sub>1</sub>- zur S-Phase (Shivakumar et al., 2002; Agathangelou et al., 2003), zum anderen finden sich Hinweise für eine Inhibition der mitotischen Progression in der frühen Prometaphase durch Komplexbildung mit Cdc20. Dadurch werden die Aktivität des Anaphase-Promoting-Complex APC gehemmt und die Cycline A und B stabilisiert (Song et al., 2004). Fenton et al. wiesen 2004 erstmalig eine Assoziation von RASSF1A mit p120<sup>E4F</sup> nach, wodurch der durch p120<sup>E4F</sup> vermittelte Zellzyklusarrest verstärkt wird. Thaler et al. zeigten in ihrer Arbeit von 2009, dass RASSF1A auch durch Heraufregulation von p21<sup>Cip1/Waf1</sup> die Progression zur S-Phase verhindern kann. Außerdem bindet RASSF1A direkt oder über mikrotubulus-assoziierte Proteine an das Mikrotubulusnetzwerk, stabilisiert dieses und scheint auch auf diesem Weg Einfluss auf den Zellzyklus zu nehmen (Liu et al., 2003; Dallol et al., 2004; Rong et al., 2004; Fraipont et al., 2012). Obwohl RASSF1A eine Ras-Association-Domain besitzt, ist dieses offensichtlich nicht in der Lage, direkt mit Ras-like-GTPasen in Kontakt zu treten und dadurch als Ras-Effektor zu fungieren. Es assoziiert lediglich über Heterodimerisierung mit seinem Homolog Nore1 mit Ras-Proteinen (Ortiz-Vega et al., 2002). Agathangelou et al. zeigten 2003 außerdem, dass RASSF1A die Expression einer Vielzahl von Genen beeinflusst und postulierten somit einen Einfluss von RASSF1A auf weitere Zellfunktionen wie Apoptose, Zelladhäsion, Zellwanderung, Angiogenese und Transkription. Proapoptotische Effekte dieses Genprodukts konnten bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen werden (Rabizadeh et al., 2004; Baksh et al., 2005; Oh et al., 2006; Matallanas et al., 2007; Foley et al., 2008). Ebenso wurde die regulative Funktion von RASSF1A bei der Zelladhäsion und -migration bestätigt (Dallol et al., 2005). Außerdem konnte durch den Nachweis von Methylierung und gleichzeitigem 3p-Allelverlust gezeigt werden, dass auf RASSF1A als Tumorsuppressorgen auch die Two-Hits-Theorie von Knudson Anwendung finden kann (Agathangelou et al., 2001). Synonym verwendete Bezeichnungen für RASSF1A sind 123F2, NORE2A, RDA32, REH3P21 (HGNC: [http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?q=data/hgnc\\_data.php&hgnc\\_id=9882](http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?q=data/hgnc_data.php&hgnc_id=9882); 17.01.2014).

### 1.4.3 Ras-Protein-Activator-Like-Protein-1 (RASAL1)

Das Ras-Protein-Activator-Like-Protein-1-Gen liegt auf Chromosom 12q23-24 und kodiert für ein GTPase-activating-protein (GAP) (Allen et al., 1998). Durch intrazelluläre Kalziumveränderungen assoziiert RASAL1 über seine C2-Domäne mit der Plasmamembran, wodurch es die intrinsische GTPase-Aktivität der smallGTPase Ras induzieren kann. Ras

überführt sich dadurch selbst von seiner aktiven GTP-gebundenen Konformation in den inaktiven GDP-gebunden Zustand (Walker et al., 2004; Sot et al., 2013). Die Funktion von RASAL1 als Ras-Regulator konnte hierbei mehrfach experimentell bestätigt werden: Die Hemmung der Translation von RASAL1 mittels siRNA führte zu einem Anstieg von GTP-gebundenem Ras (Walker et al., 2004), die ektope Expression dieses Gens hingegen zu einem Abfall von Wildtyp-RasGTP (Jin et al., 2007; Ohta et al., 2009). Zudem scheint dieses Genprodukt auch regulative Einflüsse auf die smallGTPase Rap1 zu besitzen, allerdings ohne dafür eine Assoziation mit der Plasmamembran eingehen zu müssen (Kupzig et al., 2006; Sot et al., 2013). Eine weitere Funktion von RASAL1 dürfte in der Induktion von Membrankurvaturen liegen (Sot et al., 2013). Außerdem scheint es hemmenden Einfluss auf den MAPK- und PI3K-Signalweg zu haben (Liu, D. et al., 2013).

RASAL1 wird in der Literatur auch als RASAL bezeichnet (HGNC: [http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?q=data/hgnc\\_data.php&hgnc\\_id=9873](http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?q=data/hgnc_data.php&hgnc_id=9873); 17.01.2014).

### **1.4.4 Programmed-Cell-Death-4 (PDCD4)**

Das Programmed-Cell-Death-4-Gen befindet sich auf Chromosom 10q24 (Soejima et al., 1999) und kodiert für ein die Transkription (Wang et al., 2008) und Translation regulierendes Protein (Yang et al., 2003b; Liwak et al., 2012), wodurch es auf vielfältige Weise auf das Zellwachstum (Dorrello et al., 2006; Shiota et al., 2009), Apoptose (Afonja et al., 2004; Zhang et al., 2006; Hwang et al., 2007; Bitomsky et al., 2008; Liwak et al., 2012), die neoplastische Transformation von Zellen (Cmarik et al., 1999; Yang et al., 2001; Wang et al., 2008), die Invasivität von Tumoren (Yang et al., 2006; Leupold et al., 2007; Wang et al., 2008; Nieves-Alicea et al., 2009) und die Gefäßinvasion von Tumorzellen (Leupold et al., 2007) Einfluss zu nehmen vermag.

PDCD4 bindet über seine beiden MA-3 Domänen (Yang et al., 2004; Suzuki et al., 2008) an den eukaryontischen Elongationsfaktor eIF4A (Yang et al., 2003b; Loh et al., 2009) – eine RNA-Helikase, die für das Entwinden der Sekundärstruktur an der 5'untranslatierten Region (5'UTR) der mRNA verantwortlich ist (Rozen et al., 1990). Dadurch hemmt PDCD4 dessen Helikaseaktivität und blockiert die Assoziation von eIF4A an die C-terminale Domäne von eIF4G, was Voraussetzung für die suffiziente Helikase-Aktivität dieses Faktors ist. Somit übt PDCD4 einen hemmenden Effekt auf die Translation aus (Yang et al., 2003b; Loh et al., 2009). Außerdem scheint PDCD4 die cap-unabhängige über IRES-Elemente vermittelte Translation zu kompromittieren (Liwak et al., 2012).



PDCD4 greift jedoch auch in die Transkription verschiedenster Gene regulativ ein: So interagiert sein Genprodukt beispielsweise mit den Transkriptionsfaktoren Twist (Shiota et al., 2009) und NF- $\kappa$ B (Yang et al., 2001; Sheedy et al., 2010), verhindert offensichtlich über die Regulation der Aktivität von c-jun (Yang et al., 2003a; Bitomsky et al., 2004) und eventuell auch von c-Fos (Yang et al., 2003a) die Transaktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Yang et al., 2001; Yang et al., 2003a; Jansen et al., 2005; Yang et al., 2006; Hwang et al., 2007; Wang et al., 2008; Loh et al., 2009) und beeinflusst zudem die  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängige Transkription (Wang et al., 2008). Zu den von PDCD4 in ihrer Expression beeinflussten und mit der Tumorentstehung oder -progression in Verbindung gebrachten Genen gehören beispielsweise der Urokinaserezeptor uPAR (Leupold et al., 2007), der Tissue-Inhibitor-of-Metalloprotease-2 (Nieves-Alicea et al., 2009), die Carboanhydrase II (Lankat-Buttgereit et al., 2004) und der CDK-Inhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, wobei zur Regulation von letzterem die Ergebnisse verschiedener Studien widersprüchlich sind (Göke et al., 2004; Bitomsky et al., 2008).

Hinweise für die tumorsupprimierende Funktion von PDCD4 liefert die Untersuchung von Jansen et al. aus dem Jahr 2005, die am Mausmodell zeigte, dass PDCD4 die Tumorentstehung und -progression negativ beeinflussen kann. Jin et al., 2006 gelang es überdies, das PDCD4-Gen über den als Aerosol vorliegenden Gencarrier UAC in die Lungen von KRAS-negativen Mäusen einzuschleusen und dadurch die Expression von PDCD4 zu induzieren, was die Induktion der Apoptose und die Hemmung des Zellzyklus und der Angiogenese zur Folge hatte. Ähnliches gelang Hwang et al., 2007 mit dem Gencarrier GPEI. In humanen HCC-Zelllinien fand sich eine inverse Korrelation zwischen dem Metastasierungspotential dieser Zellen und dem Expressionslevel von PDCD4 (Zhang et al., 2009).

Über die oben beschriebenen und über eine Reihe weiterer hier nicht näher erläuterten Mechanismen scheint PDCD4 also letztlich als Tumorsuppressorgen zu fungieren, wobei jedoch davon auszugehen ist, dass dies auf zelltypspezifische Art und Weise erfolgt (Lankat-Buttgereit et al., 2008). Zusätzlich soll PDCD4 auch an der Regulation von Entzündungsreaktionen beteiligt sein (Hilliard et al., 2006; Sheedy et al., 2010; Yasuda et al., 2010). Die Erkenntnisse zur Funktion von PDCD4 wurden teilweise durch Experimente am Tiermodell gewonnen.

Weitere synonym verwendete Bezeichnungen für PDCD4 sind H731 und nuclear antigen H731 (HGNC: [http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?q=data/hgnc\\_data.php&hgnc\\_id=8763](http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?q=data/hgnc_data.php&hgnc_id=8763); 17.01.2014).

### 1.4.5 Metastasis-Suppressor-1 (MTSS1)

Das Metastasis-Suppressor-1-Gen befindet sich auf Chromosom 8q24.1 (Lee et al., 2002). Allerdings wird dem Gen in einigen Datenbanken fälschlicherweise der Genort 8p22 zugeordnet (Gene: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9788>; HGNC: [http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?q=data/hgnc\\_data.php&hgnc\\_id=20443](http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?q=data/hgnc_data.php&hgnc_id=20443); 28.04.2014). Die Funktion des Genprodukts von MTSS1 ist Gegenstand intensiver Forschung, wobei die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen sich nicht immer gänzlich entsprechen:

So scheint das Protein MTSS1 an Aktin zu binden (Mattila et al., 2003; Lee et al., 2007), regulativ in die Aktinpolymerisierung (Mattila et al., 2003; Lin et al., 2005) einzugreifen, Einfluss auf die Zellpolarität (Yu et al., 2011) und -motilität zu nehmen (Lin et al., 2005; Yu et al., 2011), an der Entstehung von Plasmamembranprotrusionen (Mattila et al., 2007; Saarikangas et al., 2009; Cao, M. et al., 2012) sowie an der Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zellkontakten (Saarikangas et al., 2011; Dawson et al., 2012b) beteiligt zu sein und den Verschluss transendothelialer Tunnel (transendothelial cell macroaperture tunnel, TEM), die durch bakterielle Toxine entstehen und zur Dissemination von Bakterien beitragen (Maddugoda et al., 2011), zu induzieren. Außerdem soll es die Aufnahme von Transferrin (Cao, M. et al., 2012) und anderer extrazellulärer Moleküle (Yu et al., 2011) in die Zelle vermitteln. Des Weiteren wird eine regulative Funktion bei der Ziliogenese mesenchymaler Zellen sowie bei der Haarfollikelregeneration diskutiert (Bershteyn et al., 2010). Bestätigung der Funktion von MTSS1 als zytoskelettregulierendes und -stabilisierendes Protein findet sich durch Untersuchungen von Schilddrüsenkarzinomzellen unter Hyper- und Mikrogravitätsbedingungen, wodurch die Expression von MTSS1 hoch- beziehungsweise herunterreguliert wurde (Ulbrich et al., 2011).

Yu et al., 2012 beobachteten am Mausmodell, dass ein Fehlen der Expression von MTSS1 die B-Zell-Entwicklung beeinträchtigt und vermuteten zudem, dass dieses Gen die Zellmotilität in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen unterschiedlich beeinflusst.

Zusätzlich könnte MTSS1 während der Embryogenese am Verschluss des Neuralrohrs (Liu, W. et al., 2011: *Frosch*) und postnatal bei der Ausbildung von Axonen und Dendriten im Kleinhirn (Shi et al., 2012: *Ratte*) beteiligt sein. Bereits eine frühere Untersuchung lässt eine Beteiligung von MTSS1 an der Kleinhirnentwicklung vermuten (Glassmann et al., 2007: *Maus*).

Des Weiteren scheint MTSS1 Bestandteil der Platelet-derived Growth Factor PDGF-Signalkaskade (Wang et al., 2007b) zu sein, während seine Beteiligung am Sonic-Hedgehog-(SHH)-Signalweg umstritten ist (Callahan et al., 2004; Saarikangas et al., 2011).

Schließlich legt eine Reihe von Untersuchungen eine tumor- beziehungsweise metastasierungssupprimierende Funktion von MTSS1 nahe (u.a. Lee et al., 2002; Wang et al., 2007a: *Blase*; Liu, K. et al., 2010: *Magen*; Xie et al., 2011: *Ösophagus*; Dawson et al., 2012a: *Kopf-Hals-Bereich*; Fan et al., 2012: *Leber*). Andere Wissenschaftler zweifeln dies jedoch an (Bompard et al., 2005; Wang et al., 2011). Genauere Ausführungen hierzu finden sich im Diskussionsteil.

Letztlich ist die genaue Bedeutung von MTSS1, insbesondere im Rahmen von Tumorerkrankungen, noch nicht eindeutig geklärt. Ein Teil der Erkenntnisse zu MTSS1 wurde dabei am Tiermodell gewonnen. MTSS1 ist auch unter den Bezeichnungen Missing in Metastasis (MIM, MIMA, MIMB), KIAA0429 und BCC-enriched gene 4 (BEG4) bekannt (Callahan et al., 2004; HGNC, [http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?hgnc\\_id=20443](http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=20443); 17.01.2014).

#### 1.4.6 Tumor-Suppressor-Candidate-3 (TUSC3)

Das potentielle Tumor-Suppressor-Candidate-3-Gen (TUSC3) liegt auf Chromosom 8p22 und wird in vielen epithelialen Geweben exprimiert (MacGrogan et al., 1996).

Welche Funktion TUSC3 beziehungsweise dessen Genprodukt erfüllt, ist bis heute nicht endgültig geklärt. TUSC3 stellt eine Untereinheit der Oligosaccharyltransferase (OST) dar (Karaoglu et al., 1995: *S. cerevisiae*; Kelleher et al., 2003: *Mensch*; Nilsson et al., 2003: *Säugetier*), eines in der Evolution von eukaryontischen Zellen stark konservierten oligomeren Enzymkomplexes (Kumar et al., 1995: *Mensch*), der den kotranslationalen Transfer von Oligosacchariden auf Asparaginreste von Polypeptiden katalysiert, während diese durch das raue endoplasmatische Retikulum geschleust werden (Übersicht in: Kaplan et al., 1987: *S. cerevisiae*; Kumar et al., 1995: *Mensch*). Das mit der Oligosaccharyltransferase assoziierte vier oder sogar fünf Transmembrandomänen (Kelleher et al., 2003; Garshasbi et al., 2008) umfassende Genprodukt von TUSC3 weist Homologien zu einem Bestandteil der Oligosaccharyltransferase bei *Saccharomyces cerevisiae*, *C. elegans* und Säugetieren auf (Karaoglu et al., 1995: *S. cerevisiae*, *C. elegans*; MacGrogan et al., 1996: *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *Mensch*; Kelleher et al., 2003: *Nager*, *Mensch*) und ist nicht essentiell für die Zelle, wohl aber für die Effizienz des OST-Komplexes (Karaoglu et al.,

1995: *S. cerevisiae*; Knauer and Lehle, 1999: *S. cerevisiae*). Folglich werden von seiner Beeinflussung der N-Glykosylierung und Beteiligung beim optimalen Oligosaccharidtransfer auf Peptidketten, bei der Zusammenlagerung der Untereinheiten und der richtigen Positionierung des OST-Komplexes sowie bei der Inhibition der Faltung des zu glykosylierenden Polypeptids über eine Disulfidoxidoreduktaseaktivität bis hin zur zellulären Magnesiumaufnahme zahlreiche Funktionen von TUSC3 diskutiert (Karaoglu et al., 1995; Knauer, Lehle, 1999; Fetrow et al., 2001; Zhou et al., 2009; Jamaluddin et al., 2011; Horak et al., 2014). Aufgrund der Homologie von TUSC3 zu der Untereinheit Ost3p des OST-Komplexes von *S. cerevisiae* sind viele Erkenntnisse zu dessen Funktion aus Untersuchungen bei der Hefe abgeleitet.

Zudem wird eine Funktion von TUSC3 als Tumorsuppressorgen diskutiert (Bova et al., 1996; Pils et al., 2005). Detaillierte Ausführungen hierzu finden sich im Diskussionsteil.

Weitere synonym verwendete Bezeichnungen für TUSC3 sind N33, MGC13453, MRT7, OST3A, M33, und D8S1992 (HGNC: [http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?hgnc\\_id=30242](http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=30242); Gene, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7991>; 17.01.2014)

## 1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war, die Gene MGMT, RASSF1A, RASAL1, PDCD4, MTSS1 und TUSC3 in Tumorgewebe sowie in nicht-malignem Bronchus- und Lungengewebe auf ihren Methylierungsstatus und dessen Bedeutung beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom hin zu untersuchen. Hierbei fand mit MethyQESD (Bettstetter et al., 2008) eine Methode Verwendung, die als Kombination aus methylierungssensitivem Verdau und Real-time-PCR diese epigenetische Veränderung quantitativ nachweist, ohne dabei auf die Bisulfidkonversion der DNA angewiesen zu sein. Der Methylierungsstatus wurde schließlich in Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Parametern analysiert und die Ergebnisse unter Berücksichtigung des Forschungsstandes diskutiert.

## 2 Patientengut

### 2.1 Patientengewebe

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Gewebe von 42 an Lungenkarzinomen erkrankten Patienten untersucht, die sich in den Jahren 2000 bis 2002 am Universitätsklinikum Regensburg einer Tumorresektion unterzogen hatten. Von jedem Patienten konnte ausreichend DNA aus Tumor- und normalem Lungengewebe für die Methylierungsanalyse aller sechs in dieser Arbeit untersuchten Gene isoliert werden. Die Isolierung von DNA aus Bronchialmukosa gestaltete sich in vielen Fällen schwierig, da häufig nicht genügend Bronchusgewebe zur Verfügung stand. Tabelle 2.1 zeigt eine Übersicht über die Anzahl der pro Gen untersuchten Patientengewebe. Sämtliche DNA wurde aus paraffin-eingebettetem Gewebe gewonnen.

Gewebetyp	Untersuchtes Gen					
	MGMT	RASSF1A	RASAL1	PDCD4	MTSS1	TUSC3
Bronchus	28	29	27	27	24	28
Lunge	42	42	42	42	42	42
Tumor	42	42	42	42	42	42

**Tabelle 2.1** Anzahl der pro Gen untersuchten Gewebe

### 2.2 Patientendaten

#### 2.2.1 Klinische Daten

Diese Arbeit stützt sich auf die vom Tumorzentrum Regensburg erfassten klinischen Daten, die letztmalig am 19.9.2009 aktualisiert wurden, sowie auf Archivmaterial des Universitätsklinikums Regensburg. Es wurden nur Patienten in die Studie aufgenommen, die an einem primären Lungenkarzinom erkrankt waren, wobei sowohl Vor- und Begleiterkrankungen als auch die familiäre Disposition unberücksichtigt blieben. Zwei Patienten erhielten eine neoadjuvante Therapie, was ebenfalls kein Ausschlusskriterium für diese Untersuchung darstellte. Neben Angaben zum Geschlecht, Alter, Überleben, Krankheitsverlauf und zur Therapie standen auch Daten zum Nikotinkonsum der Studienteilnehmer zur Verfügung.

### 2.2.2 Pathologische Daten

Zur Erfassung der pathologischen Daten konnte auf das Dokumentationssystem (PAS-System) des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg sowie auf Datenerhebungen des Tumorzentrums Regensburg zurückgegriffen werden.

Bei den Lungenkarzinomen werden verschiedene histologische Typen unterschieden: Dabei spielt zunächst die Differenzierung zwischen kleinzelligem (SCLC) und nicht-kleinzelligem Karzinom (NSCLC) gerade hinsichtlich der sich anschließenden Therapie eine wichtige Rolle (Übersicht in: Junker, 2006). Die Gruppe der nicht-kleinzelligen Karzinome wird in weitere Subtypen unterteilt, zu denen im Wesentlichen das Adenokarzinom einschließlich des bronchioloalveolären Karzinoms, das adenosquamöse, großzellige sowie das Plattenepithelkarzinom gezählt werden (Übersicht in: Travis, 2004; Übersicht in: Junker, 2006). Diese Arbeit unterscheidet zwischen Adenokarzinomen, unter denen auch bronchioloalveoläre und adenosquamöse Karzinome zusammengefasst wurden, Plattenepithelkarzinomen und großzelligen Karzinomen. Die übrigen Tumore wurden in die Gruppe „neuroendokrine Karzinome“ eingeordnet, worunter sich ein Kombinationstumor sowie ein neuroendokriner Kleinzeller befanden.

Das Staging der Patienten erfolgte nach der TNM-Klassifikation, wobei „T“ den Primärtumor, „N“ die regionären Lymphknoten, die sich von der Supraklavikularregion bis hin zum Zwerchfell erstrecken, und „M“ die Fernmetastasen beschreibt (Wittekind, Meyer, 2010). Zum Operationszeitpunkt besaß die fünfte Auflage der TNM-Klassifikation der *Union internationale contre le cancer* (UICC) Gültigkeit. Die in diese Untersuchung eingeschlossenen Patienten wurden jedoch nach der siebten Auflage der TNM-Klassifikation aus dem Jahr 2010 umklassifiziert (Wittekind, Meyer, 2010). Eine aktuelle Version der TNM-Klassifikation zum Bronchialkarzinom befindet sich im Anhang.

Zudem konnte durch ein histopathologisches Grading der Differenzierungsgrad der Tumorzellen festgelegt und anhand der TNM-Klassifikation das Tumorstadium bestimmt werden. Letzteres ist gerade beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom hinsichtlich der Therapieentscheidung bedeutsam (Übersicht in: Junker, 2006).

Schließlich fanden Angaben zum Residualtumor Eingang in die statistische Auswertung.

## 3 Materialien

### 3.1 Chemikalien

#### DNA-Isolierung

MagNA Pure LC DNA-Isolation Kit II  
(Tissue)

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

#### Einfärbemittel

Methylenblau

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Taufkirchen

#### Entparaffinierung

Ethanol

Bundesmonopol, München

Xylol

JT Baker, Deventer, Netherlands

#### PCR

Primer

metabion international AG, Martinsried

QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit

QIAGEN, Hilden

#### Restriktionsendonukleasen

Hin6I, XbaI, DraI, 10X Buffer Tango™

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

#### Weitere Chemikalien

RNase Away

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

### 3.2 Geräte

#### DNA-Isolierung

MagNA Pure LC

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

#### DNA-Vermessung

NanoDrop® ND-1000

Peqlab Biotechnologie GmbH,  
Erlangen

#### Färbeküvetten

Färbeküvetten mit Glasgestell und Drahtbügel

VWR International GmbH, Darmstadt

Färbeküvetten nach Hellendahl

VWR International GmbH, Darmstadt

#### Mikroskop

Stereomikroskop Typ DRC/L

Carl Zeiss Jena GmbH, Jena

#### Pipetten

Finnpipette

ThermoLabsystems, Waltham, USA

#### Thermocycler

LightCycler 1.0

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

LightCycler® 480

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

### **Thermomixer**

Thermomixer compact

Eppendorf AG, Hamburg

### **Vortexer**

MS2 Minishaker

IKA-Labortechnik, Staufen

### **Wärmeschrank**

Heraeus Instruments Typ B 6060

Heraeus Holding GmbH, Hanau

### **Zentrifugen**

Centrifuge 5415 D

Eppendorf AG, Hamburg

Centrifuge 5810 R

Eppendorf AG, Hamburg

LC Carousel Centrifuge

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

## **3.3 Verbrauchsmaterialien**

### **Eppendorf-Cups**

PCR Softtubes 0,5 ml

Biozym Scientific GmbH,  
Hess. Oldendorf

Safe-Lock-Tubes 1,5 ml und 2,0 ml

Eppendorf AG, Hamburg

### **Objektträger**

50 Objektträger

Engelbrecht Medizin- und Labor-  
technik GmbH, Edermünde

### **PCR**

LightCycler® Capillaries (20 µl)

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

LightCycler® 480 Sealing Foil

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

### **Pipettenspitzen**

Safeseal Tips Premium 10, 20, 200 und 1000 µl

Biozym Scientific GmbH,  
Hess. Oldendorf

### **Skalpellklingen**

Surgical blade stainless No.11

Feather Safety Razor Co., LTD.,  
Osaka, Japan (Zentrallager Universität  
Regensburg)

### **Zentrifugenfilter**

Amicon® Ultra 0,5 ml Centrifugal Filters

Millipore GmbH, Schwalbach

## **3.4 Software**

Excel® 2007, Office Home and Student 2007

Microsoft Corporation, Redmond, USA

LightCycler Software Version 3.5

Idaho Technology Inc., Idaho Falls,  
USA

LightCycler® 480 Software 1.5.0  
20

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim



MagNA Pure LC Software Version 3.0.11  
ND-1000 V3.3

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim  
NanoDrop Technologies, Inc.,  
Wilmington, USA

PASW Statistics 17

SPSS GmbH Software, an IBM  
Company, München

## **4 Methoden**

### **4.1 Isolierung von DNA aus Patientengewebe**

Zur Untersuchung der quantitativen Methylierung ausgewählter Gene wurde die DNA von 42 Patienten separat aus Bronchus-, Lungen- und Tumorgewebe isoliert.

#### **4.1.1 Mikrodissektion**

Von jedem Resektat, so auch von Geweben der in dieser Arbeit untersuchten Patienten, werden routinemäßig Paraffinblöcke hergestellt und archiviert. Von diesen Blöcken wurden Paraffinschnitte mit vier Mikrometer Dicke angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Anzahl der Schnitte pro Block betrug zwischen vier und zehn.

Anschließend erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte. Dazu wurden diese zunächst für 30 Minuten bei 70 °C im Thermoschrank erwärmt und durch eine absteigende Xylol-Alkoholreihe gezogen. Die Verweildauer im Xylol betrug zweimal zehn Minuten. Danach verblieben die Gewebeschnitte je zweimal für drei bis fünf Minuten in 100%igem, 96%igem und 70%igem Ethanol und wurden schließlich in deionisiertem Wasser von Alkoholrückständen befreit.

Die Anfärbung der entparaffinierten Schnitte erfolgte mit Methylenblau der Konzentration 0,01%. Dazu wurden diese für einige Sekunden in eine Färbeküvette mit Methylenblaulösung gehalten und anschließend die überschüssige Farbe mit deionisiertem Wasser entfernt.

Die Mikrodissektion von Bronchus-, Lungen- und Tumorgewebe erfolgte unter einem Stereomikroskop mit vierzigfacher Vergrößerung. Als Vorlage dienten mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbte Schnitte, auf denen ein Pathologe zuvor die entsprechenden Bronchus-, Lungen- und Tumoreale gekennzeichnet hatte. Das zu mikrodissezierende Gewebe wurde mit sterilen Skalpellklingen vom Objektträger entfernt und in 1,5 ml Cups überführt, in denen 80 µl Lysepuffer und 20 µl Proteinase K aus dem MagNA Pure LC DNA-Isolation Kit II (Tissue) von Roche vorgelegt waren, und über Nacht bei 57 °C inkubiert.

#### **4.1.2 DNA-Isolierung mittels MagNA Pure LC**

Die weiteren Schritte der DNA-Isolierung aus mikrodisseziertem Gewebe wurden mit dem Gerät MagNA Pure LC und dem zugehörigen MagNA Pure LC DNA-Isolation Kit II

(Tissue) von Roche nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dabei fand die Software MagNA Pure LC Version 3.0.11 mit dem Programm „Protocoll DNA II Tissue External\_Proteinase\_K.blk“ Verwendung.

## 4.2 Konzentrationsbestimmung und Aufkonzentrierung von DNA

### 4.2.1 Vermessung von DNA

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem NanoDrop® ND-1000 von Peqlab bestimmt. Dabei gilt für die Vermessung von Nukleinsäuren die modifizierte Form des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

$$c = (A * e)/b$$

mit  $c$  = Konzentration in ng/μl,  $A$  = Absorption,  $e$  = Extinktionskoeffizient in ng\*cm/μl und  $b$  = Lichtweg in cm. Der Extinktionskoeffizient für die Vermessung doppelsträngiger DNA beträgt 50 ng\*cm/μl (ND-1000 Spectrophotometer: V3.3 User's Manual).

Zur Beurteilung der Reinheit der DNA wird der Quotient der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm herangezogen. Dabei kann bei einem Wert im Bereich von 1,8 im Allgemeinen von einer solchen ausgegangen werden (ND-1000 Spectrophotometer: V3.3 User's Manual).

Nach der Reinigung und Initialisierung des Gerätes erfolgte der Abgleich mit Millipore-Wasser. Für die Konzentrationsbestimmung wurden 1,5 bis 2 μl der Proben eingesetzt.

### 4.2.2 Aufkonzentrierung von DNA

Für die im Anschluss durchgeführte *real-time* PCR waren DNA-Konzentrationen von mindestens 20 ng/μl notwendig, welche insbesondere beim Bronchusgewebe durch die alleinige DNA-Isolierung teilweise nicht erreicht werden konnten. Daher mussten diese Proben mithilfe von Amicon® Ultra 0,5 ml Centrifugal Filtern der Millipore GmbH aufkonzentriert werden. Hierfür wurde die Probe vollständig in den Zentrifugenfilter, der zuvor in ein dazugehöriges Cup eingebracht worden war, überführt und 4 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Cup mit dem Filtrat wurde anschließend verworfen, der Filter selbst umgekehrt in ein frisches Cup platziert und erneut 3 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Konzentrat befand sich nun im neuen Cup, dessen Konzentration im Anschluss bestimmt werden konnte.

### 4.3 Quantitative Methylierungsanalyse

Die quantitative Methylierungsbestimmung erfolgte mit der MethyQESD-Methode (methylation-quantification of endonuclease-resistant DNA). Hierbei handelt es sich um eine Kombination aus einem methylierungssensitiven Verdau mit anschließender *real-time* PCR (Bettstetter et al., 2008).

Die genomische DNA wird zunächst in zwei separaten Ansätzen verdaut. Im Quantifizierungsansatz kommt das methylierungssensitive Restriktionsenzym Hin6I (Schnittstelle: 5'-GCGC-3'), das ausschließlich nicht-methylierte DNA schneidet, zum Einsatz. Dabei müssen sich die Schnittstellen des Enzyms innerhalb der zu amplifizierenden Promotorregion befinden, so dass bei fehlender Methylierung der zu untersuchende DNA-Abschnitt verdaut wird. In der PCR entsteht in diesem Fall kein Produkt, bei durch Methylierung blockiertem Verdau hingegen schon. Im Kalibrierungsansatz werden die Restriktionsenzyme XbaI (Schnittstelle: 5'-TCTAGA-3') und DraI (Schnittstelle: 5'-TTTAAA-3') verwendet, deren Schnittstellen sich außerhalb der zu analysierenden Region befinden. Dadurch wird die DNA ebenfalls fragmentiert, was eine vergleichbare PCR-Effizienz wie im Quantifizierungsverdau ermöglicht, das zu amplifizierende Fragment bleibt jedoch erhalten (Bettstetter et al., 2008). Somit dient der Kalibratorverdau als methylierungsunabhängige probenspezifische Kontrolle.

In der sich anschließenden *real-time* PCR von Quantifizierungs- und Kalibratorverdau werden die  $C_t$ -Werte ermittelt und deren Differenz

$$\Delta C_t = C_t (\text{Kalibratorverdau}) - C_t (\text{Quantifizierungsverdau})$$

gebildet. Der Anteil der methylierten DNA lässt sich mit der Formel

$$\% = E^{\Delta C_t} * 100$$

berechnen, wobei es sich bei E um die PCR-Effizienz handelt, die durch Standardkurven ermittelt wurde. Entsteht im Quantifizierungsansatz in der PCR kein Produkt, so liegt keinerlei Methylierung in der untersuchten Genregion vor (Bettstetter et al., 2008).

Als PCR-Effizienz wurde bei den Genen MGMT, RASSF1A, RASAL1, PDCCD4 und MTSS1 der Wert 1,97, bei TUSC3 der Wert 1,94 verwendet.

Bei allen sechs untersuchten Genen diente aus gepooltem Vollblut gewonnene nicht-methylierte DNA als Negativ-Kontrolle. Als Positiv-Kontrolle wurde methylierte DNA verschiedener Zelllinien verwendet (Tabelle 4.1).

Untersuchtes Gen	Zelllinie als Positivkontrolle
MGMT	SW48
RASSF1A	SW48
RASAL1	HT29
PDCD4	keine
MTSS1	SW48
TUSC3	SW48

**Tabelle 4.1** Als Positiv-Kontrolle verwendete Zelllinien

### 4.3.1 Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Für die quantitative Methylierungsbestimmung mit der MethyQESD-Methode (Bettstetter et al., 2008) musste die DNA mittels Restriktionsendonukleasen verdaut werden. Dabei waren ein Quantifizierungs- und ein Kalibratorverdau mit jeweils einem Reaktionsvolumen von 20 µl notwendig. Beide Ansätze enthielten 2 µl des 10X Buffer Tango™ (Fermentas GmbH). Im Quantifizierungsverdau wurden 40 U der Restriktionsendonuklease Hin6I (Fermentas GmbH) eingesetzt, im Kalibrierungsverdau jeweils 20 U der Restriktionsenzyme XbaI und DraI (Fermentas GmbH). Anschließend wurde die zu verdauende DNA in den Reaktionsansatz pipettiert, wobei mindestens 100 ng DNA im Ansatz enthalten sein mussten, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Das fehlende Reaktionsvolumen wurde mit Millipore-Wasser ergänzt.

Um sämtliche DNA mit den Restriktionsenzymen in Kontakt zu bringen, wurden die Reaktionsansätze zentrifugiert, kräftig gevortext und erneut gut zentrifugiert. Über Nacht erfolgte die Inkubation der Verdaue im Wärmeschrank bei 37 °C.

Zum Abstoppen der Reaktion musste das Kondenswasser abzentrifugiert und die Enzyme für 20 Minuten bei 70 °C inaktiviert werden. Die Verdaue wurden im Anschluss auf Eis abgekühlt, zentrifugiert, kurz gevortext und erneut zentrifugiert und schließlich bei 4 °C aufbewahrt.

Bei jeder Verdauserie wurden gleichzeitig Blut und SW48 mitverdaut sowie jeweils für den Quantifizierungs- als auch Kalibrierungsansatz eine Leerkontrolle, die keinerlei DNA enthielt, angesetzt. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass bereits der Mastermix der Verdauansätze durch DNA kontaminiert war.

### 4.3.2 Primerdesign

Für das Design der Primer stand das Softwareprogramm *Primer 3* (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) zur Verfügung. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma *metabion international AG* in Martinsried.

### 4.3.3 Oligonukleotide

<u>Primer</u>	<u>Sequenz (5' → 3')</u>
MGMT Msdig F1	CCC GGA TAT GCT GGG ACA G
MGMT Msdig R1	CCC AGA CAC TCA CCA AGT CG
MSDig RASSF1A F3	GCT GGG CGC GCT GGG AAG
MSDig RASSF1A R3	CAG GGA CCA GCT GCC GTG T
RASAL1 MSDig F2	CTC CAG ACG CCT CGG CAA GAG
RASAL1 MSDig R3	AGC GCC CGT CCG GAC TCT AC
PDCD4 Msdig F2	CCA GTC CCA GGA GCC ACA T
PDCD4 Msdig R2	GAG GAA AAG GGA GAG GAG TGA
MTSS1-2F	GAG CCC AGC CAG AGC GAG C
MTSS1-2R	CGG CGT CCG GAT CTG TTG CT
TUSC3-B-F1	TAC CGC GCG TGG AGG AGA CA
TUSC3-B-R1	GTG GGC AGG TAC CGC AGC C

### 4.3.4 Charakterisierung des Amplifizierungssegments

Die Länge der zu amplifizierenden Sequenzen betrug zwischen 81 und 101 Basenpaaren, ihre Lokalisation wurde in Relation zum Transkriptionsstartpunkt am Startcodon ATG ermittelt. In Tabelle 4.2 sind die Lage und Länge sowie die Anzahl der Schnittstellen und CpG-Dinukleotide der Amplikons aufgelistet.

Gen	Lage (bp)	Länge (bp)	Anzahl der Schnittstellen	Anzahl der CpG-Dinukleotide
MGMT	-7 bis +94	101	2	13
RASSF1A	+45 bis +145	100	4	14,5
RASAL1	-278 bis -187	91	3	11
PDCD4	-4305 bis -4224 <sup>1)</sup>	81	3	5
MTSS1	-528 bis -439	89	2	13
TUSC3	-33 bis +65	98	2	13

1) Der große Abstand zum Startcodon bei PDCD4 erklärt sich durch das nichttranslatierte Exon 1 und das große Intron 1 mit 3947 Basenpaaren.

**Tabelle 4.2 Charakterisierung des Amplifizierungssegments**

### 4.3.5 Real-time PCR am LightCycler 1.0

Die Methylierungsanalyse der Gene MGMT, RASSF1A, RASAL1, PDCD4 und MTSS1 erfolgte ausschließlich am Gerät LightCycler 1.0 der Firma Roche.

Das in LightCycler® Kapillaren der Firma Roche pipettierte Reaktionsvolumen betrug 20 µl und enthielt 3 µl des DNA-Verdauers, 10 µl des QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN) sowie 0,5 µM Primer. Das fehlende Reaktionsvolumen wurde mit Millipore-Wasser ergänzt. Die verschlossenen Kapillaren wurden in das LightCycler-Karussell platziert und bis auf 3000 rpm zentrifugiert.

Auf eine 15minütige initiale Denaturierung bei 95 °C folgte die Amplifizierung mit 45 Zyklen, wobei für die verschiedenen Gene unterschiedliche Temperaturen und Zeiten galten (Tabelle 4.2).

Gen	Denaturierung		Annealing		DNA-Synthese	
	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Temperatur (°C)	Dauer (s)
MGMT	94	10	60	17	72	10
RASSF1A	95	10	65	17	72	15
RASAL1	95	15	66 <sup>1)</sup>	20 <sup>1)</sup>		
PDCD4	94	10	60	17	72	10
MTSS1	94	15	66	20	72	15

1) Two-step-PCR

**Tabelle 4.3 Temperaturen und Zeiten während der Amplifizierung am LightCycler 1.0**

Zur Ermittlung der Schmelzkurve wurden die Proben unter kontinuierlicher Fluoreszenzmessung mit einer Geschwindigkeit von 0,2 °C/s von 55 °C auf 98 °C (99 °C bei RASAL1) erhitzt. Bei der Durchführung der *real-time* PCR fand das Programm „LightCycler Software Version 3“ Verwendung. Die Berechnung des Anteils methylierter DNA erfolgte mit der Software „Excel® 2007“.

Die Methylierungsanalyse wurde teils in Einfach-, teils in Doppelbestimmungen durchgeführt, strittige Werte wurden wiederholt. Zudem lief bei jeder PCR mindestens eine Negativkontrolle mit, die anstelle von DNA Millipore-Wasser enthielt.

#### 4.3.6 *Real-time* PCR am LightCycler® 480

Für das Gen TUSC3 fand lediglich die Etablierung der Methylierungsanalyse am LightCycler 1.0 statt. Die eigentliche Methylierungsbestimmung erfolgte hingegen am LightCycler® 480 der Firma Roche unter Verwendung des Programms „LightCycler® 480 Software 1.5.0“. Hierfür mussten nur kleine Änderungen im Bereich der Amplifizierungstemperaturen und -zeiten im Vergleich zum LightCycler 1.0 vorgenommen werden (Tabelle 4.3).

Gen	Denaturierung		Annealing		DNA-Synthese	
	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Temperatur (°C)	Dauer (s)
TUSC3	95	15	60	34	72	20

**Tabelle 4.4** Temperaturen und Zeiten während der Amplifizierung bei TUSC3 am LightCycler® 480

Auf die initiale Denaturierung bei 95 °C für 15 Minuten folgte die Amplifizierung mit 42 Zyklen. Für die Erstellung der Schmelzkurve wurden die Proben unter kontinuierlicher Fluoreszenzmessung mit einer Geschwindigkeit von 0,11 °C/s von 50 °C auf 98 °C erhitzt.

Das Pipettierschema für den Reaktionsansatz konnte unverändert übernommen werden (siehe 4.3.4). Als Reaktionsgefäß dienten LightCycler® 480 Multiwell Plates der Firma Roche, die mit einer Sealing-Folie (Roche) verschlossen und für eine Minute bei 1000 G zentrifugiert wurden. Bei jeder PCR liefen vier Negativ-Kontrollen mit. Die Berechnung des Anteils methylierter DNA erfolgte mit dem Softwareprogramm „Excel® 2007“.



#### **4.3.7 Standardkurve am LightCycler® 480**

Würde bei jedem Amplifizierungszyklus die im Ansatz enthaltene DNA exakt verdoppelt werden, so betrüge die Effizienz der PCR 2. Diese Effizienz wird in der Regel jedoch nicht erreicht, so dass für die meisten PCRs niedrigere Werte gelten.

Zur Ermittlung der PCR-Effizienz E für das Gen TUSC3 am LightCycler® 480 wurde sowohl für den Quantifizierungs- als auch den Kalibratorverdau eine Standardkurve erstellt. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe der Stufen 1:4, 1:16, 1:64, 1:256, 1:1024, 1:4096 und 1:16384 hergestellt und, um Pipettierfehler zu minimieren, in Vierfachansätzen in die PCR eingesetzt. Mithilfe der „LightCycler® 480 Software 1.5.0“, in die zuvor die Verdünnungsstufen eingegeben worden waren, ließ sich die Effizienz der PCR berechnen.

#### **4.4 Statistische Auswertung**

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit der Software „PASW Statistics 17“ unter Verwendung des zweiseitigen exakten Tests nach Fisher, wobei ein p-Wert kleiner 0,05 als statistisch signifikant galt. Für die Schätzung der Überlebensfunktion wurde das Verfahren nach Kaplan-Meier angewendet, für den Vergleich der Überlebenskurven der Logrank-Test. Auch hier galt ein p-Wert kleiner 0,05 als statistisch signifikant.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Patientengut

#### 5.1.1 Klinische Daten

In dieser Arbeit wurde Gewebematerial von 42 Patienten, darunter 33 Männer (78,6%) und neun Frauen (21,4%), untersucht. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung betrug 59 Jahre (Median 59,5 Jahre). 23 Patienten waren zum Diagnosezeitpunkt 60 Jahre oder jünger, 19 Patienten älter als 60 Jahre. Die Altersspanne erstreckte sich zwischen 38 und 77 Jahren.

Charakteristikum	Anzahl der Patienten	Prozent (%)
<b>Gesamt</b>	42	100,0
<b>Geschlecht</b>		
Männlich	33	78,6
Weiblich	9	21,4
<b>Alter bei Diagnose</b>		
≤ 60 Jahre	23	54,8
> 60 Jahre	19	45,2
<b>Überlebensstatus</b>		
Lebend <sup>1)</sup>	13	31,0
Verstorben	28	66,7
Unbekannt	1	2,4
<b>Nikotinabusus</b>		
Ja	37	88,1
Nein	5	11,9

1) lebend gemeldet am 05.08.2009, 06.08.2009, 08.08.2009 oder 19.09.2009

**Tabelle 5.1 Zusammenfassung der klinischen Daten**

Zum Zeitpunkt der letzten Datenerfassung waren 28 Patienten (66,7%) verstorben, die übrigen 13 Patienten (31%) wurden im Zeitraum vom 05.08.2009 bis zum 19.09.2009 als lebend gemeldet. Von einem Patienten fehlten die Angaben. Somit betrug die mittlere Überlebenszeit 55 Monate (Median 49 Monate). Neben Daten zum Krankheitsverlauf und zur Therapie standen Angaben zum Nikotinabusus zur Verfügung. Demnach rauchten 37 der 42 Patienten, was einem Raucheranteil von 88,1 Prozent entspricht. Unter den fünf

Nichtrauchern befanden sich ein Mann und vier Frauen. Die klinischen Daten sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

### 5.1.2 Pathologische Daten

Wie im Kapitel 2.2.2 beschrieben wurden die histologischen Subtypen in vier Gruppen eingeteilt: Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome, großzellige Karzinome und neuroendokrine Karzinome. Plattenepithelkarzinome nahmen dabei im Untersuchungsgut den größten Teil ein, gefolgt von Adenokarzinomen. Großzellige Karzinome sowie neuroendokrine Tumoren spielten eine untergeordnete Rolle.

Tumortyp	Anzahl	Prozent (%)
Adenokarzinom <sup>1)</sup>	17	40,5
Plattenepithelkarzinom	20	47,6
Großzelliges Karzinom	3	7,1
Neuroendokrine Karzinome <sup>2)</sup>	2	4,8

1) einschließlich bronchioloalveoläres Karzinom und adenosquamöses Karzinom

2) umfasst einen Kombinationstumor (aus gering differenziertem Plattenepithelkarzinom und gering differenziertem neuroendokrinen Kleinzeller) und einen neuroendokrinen Kleinzeller

**Tabelle 5.2 Verteilung der histologischen Tumortypen unter den Patienten dieser Arbeit**

Bei der Einteilung der Tumoren nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation von 2010 überwog das Stadium pT2 im Patientenkollektiv, zwei Drittel der untersuchten Patienten wies keine regionalen Lymphknotenmetastasen auf, lediglich in drei Fällen lag eine Fernmetastasierung vor. Die Verteilung des T-, N- und M-Stadiums ist in den Tabellen 5.3 bis 5.6 dargestellt. Das T-Stadium wurde sowohl nach übergeordneten einfachen Stadiengruppen als auch detailliert nach Stadienuntergruppen ausgewertet.

Der Differenzierungsgrad der Karzinome verteilte sich relativ ausgeglichen auf die Stadien G2 und G3. Lediglich bei vier Patienten konnte der Tumor nicht im Gesunden reseziert werden. Zum Operationszeitpunkt befanden sich mehr als zwei Drittel der Patienten in den Erkrankungsstadien I und II. Die Angaben zum histopathologischen Grading, zum Residualtumor und zur Stadiengruppierung ist den Tabellen 5.7 bis 5.10 zu entnehmen.

	Anzahl	Prozent (%)
T1	10	23,8
T2	24	57,1
T3	3	7,1
T4	5	11,9
Gesamt	42	100,0

**Tabelle 5.3** Verteilung des T-Stadiums (Primärtumor) nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation von 2010, einfach

Primärtumor T	Anzahl, detailliert	Prozent (%), detailliert
T1a	8	19,0
T1b	2	4,8
T2a	16	38,1
T2b	8	19,0
T3	3	7,1
T4	5	11,9
Gesamt	42	100,0

**Tabelle 5.4** Verteilung des T-Stadiums (Primärtumor) nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation von 2010, detailliert

Regionäre Lymphknoten N	Anzahl	Prozent (%)
N0	28	66,7
N1	11	26,2
N2	3	7,1
Gesamt	42	100,0

**Tabelle 5.5** Verteilung des Lymphknotenstatus N nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation von 2010

<b>Fernmetastasen M</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent (%)</b>
M0	38	90,5
M1	3	7,1
Unbekannt	1	2,4
Gesamt	42	100,0

**Tabelle 5.6**     **Verteilung der Fernmetastasen M nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation von 2010**

<b>Grading G</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent (%)</b>
G2	24	57,1
G3	18	42,9
Gesamt	42	100,0

**Tabelle 5.7**     **Verteilung des histopathologischen Gradings nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation von 2010**

<b>Residualtumor R</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent (%)</b>
R0	38	90,5
R1	3	7,1
R2	1	2,4
Gesamt	42	100,0

**Tabelle 5.8**     **Verteilung des Residualtumorstadiums nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation von 2010**

<b>Stadium</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent (%)</b>
Stadium I	19	45,2
Stadium II	10	23,8
Stadium III	9	21,4
Stadium IV	3	7,1
Unbekannt/X	1	2,4
Gesamt	42	100,0

**Tabelle 5.9**     **Stadienverteilung nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation von 2010, einfach**

Stadium	Anzahl	Prozent (%)
Stadium IA	8	19,0
Stadium IB	11	26,2
Stadium IIA	9	21,4
Stadium IIB	1	2,4
Stadium IIIA	9	21,4
Stadium IIIB	0	0,0
Stadium IV	3	7,1
Unbekannt/X	1	2,4
Gesamt	42	100,0

**Tabelle 5.10** Stadienverteilung nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation von 2010, detailliert

## 5.2 Methylierungsstatus

In dieser Arbeit wurden sechs Gene hinsichtlich ihrer Methylierung in Bronchus-, Lungen- und Tumorgewebe derselben Patienten untersucht: MGMT, RASSF1A, RASAL1, PDCD4, MTSS1 und TUSC3.

### 5.2.1 Auswahl der Gene

Die Auswahl der Gene MGMT, RASSF1A, RASAL1 und MTSS1 erfolgte durch Literaturrecherche. Die Gene PDCD4 und TUSC3 wurden anhand eines Datensatzes zur Genexpression in Bronchialepithel, peripherem Lungengewebe und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, der mittels des Affymetrix U133A Microarrays gewonnen wurde, ausgewählt. Beide Gene waren sowohl im Plattenepithelkarzinom als auch im Adenokarzinom im Vergleich zum Bronchialepithel herunterreguliert (Woenckhaus et al., 2006).

### 5.2.2 Festlegung des Cut-off-Werts

Ein Gewebe wurde dann als methyliert angesehen, wenn sich in der quantitativen Methylierungsanalyse ein Wert größer 4 Prozent nachweisen ließ. Die Entscheidung für einen Cut-off-Wert von 4 Prozent wurde dadurch gestützt, dass sich in früheren Studien ab diesem Methylierungsniveau Hinweise für einen Expressionsverlust fanden (Ogino et al.,

2006) beziehungsweise eine gute Differenzierung zwischen normalem und prämaligmem/malignem Gewebe möglich war (Eads et al., 2000). Auch andere Arbeiten orientierten sich an diesem Wert (Feng et al., 2008; Wu et al., 2010).

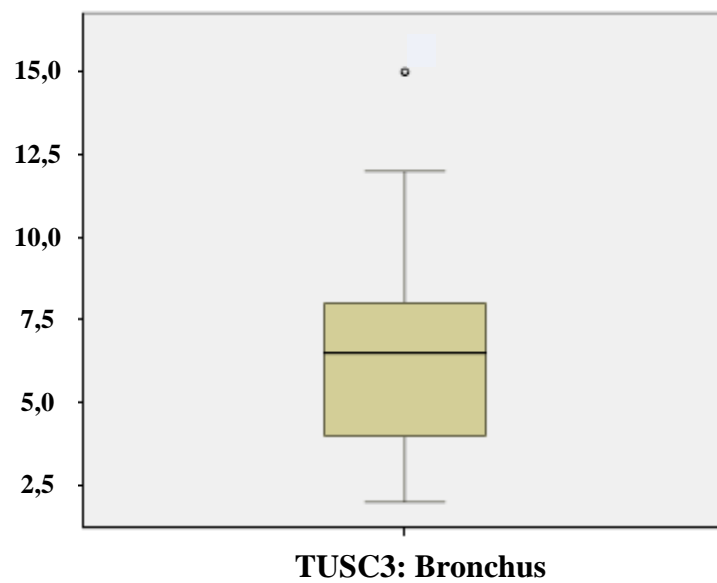
### 5.2.3 Methylierung im Bronchus-, Lungen- und Tumorgewebe

Tabelle 5.11 beschreibt die Häufigkeit von methyliertem Gewebe im Patientenkollektiv.

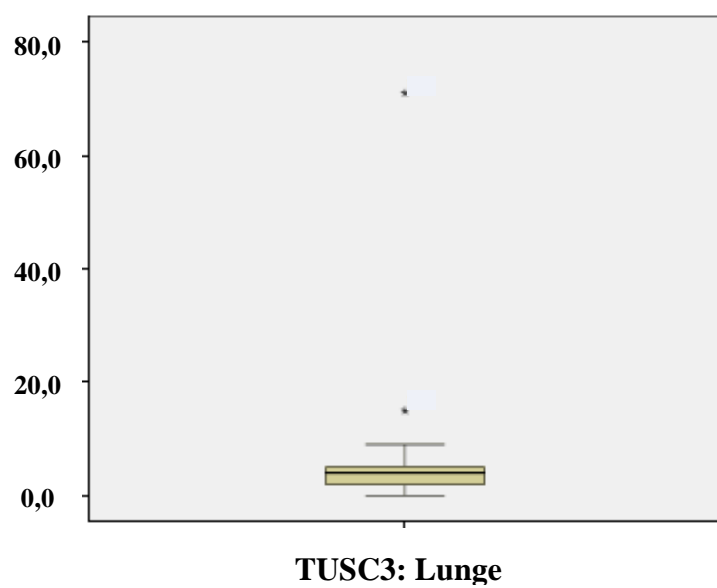
Untersuchtes Gen	Gewebetyp					
	Bronchus		Lunge		Tumor	
	%	n/ngesamt	%	n/ngesamt	%	n/ngesamt
MGMT	7,1	2/28	2,4	1/42	7,1	3/42
RASSF1A	3,4	1/29	0,0	0/42	26,2	11/42
RASAL1	0,0	0/27	2,4	1/42	4,8	2/42
PDCD4	0,0	0/27	0,0	0/42	0,0	0/42
MTSS1	0,0	0/24	0,0	0/42	0,0	0/42
TUSC3	67,9	19/28	31,0	13/42	59,5	25/42

**Tabelle 5.11 Methylierung von Bronchus-, Lungen- und Tumorgewebe**

In keinerlei Gewebe ließ sich eine Methylierung von PDCD4 und MTSS1 nachweisen. MGMT war in allen drei Geweben sporadisch methyliert, wenn auch geringfügig häufiger in Bronchus- und in Tumor- als in normalem Lungengewebe. Für RASAL1 fand sich vereinzelt ein positives Ergebnis in Lunge und Tumor, nicht jedoch im Bronchialepithel. RASSF1A wies keine Methylierung im Lungengewebe, dafür sporadisch im Bronchus und in einem Viertel der Tumorproben auf. Lediglich bei TUSC3 zeigte sich im gesamten Untersuchungsgut regelmäßig eine Methylierung, wobei diese im Bronchialepithel am häufigsten nachgewiesen werden konnte, gefolgt von Tumor und Lunge. Die Verteilung der einzelnen Methylierungswerte in Prozent von TUSC3 im Untersuchungskollektiv ist für die verschiedenen Gewebe in den folgenden Boxplot-Diagrammen (Abbildung 5.1 bis 5.3) dargestellt.

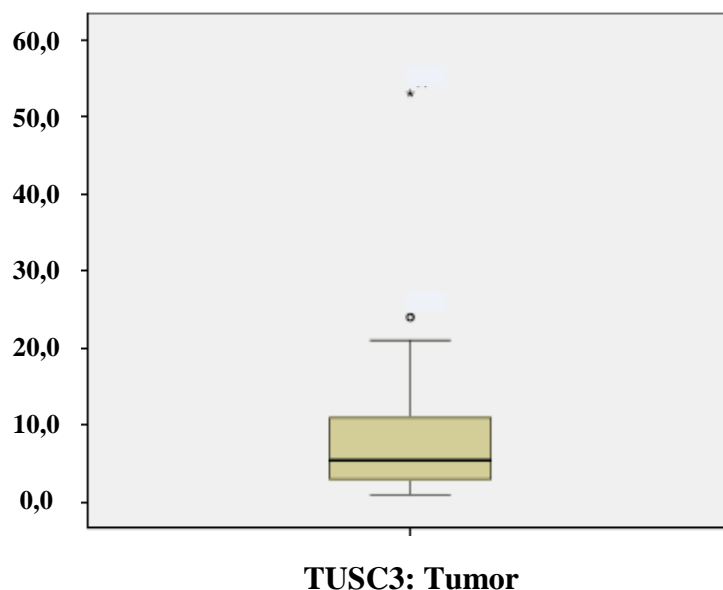


**Abbildung 5.1** Verteilung der Methylierungswerte in Prozent von TUSC3 im Bronchialgewebe



**Abbildung 5.2** Verteilung der Methylierungswerte in Prozent von TUSC3 im Lungengewebe





**Abbildung 5.3** Verteilung der Methylierungswerte in Prozent von TUSC3 im Tumorgewebe

Im gepoolten Vollblut gesunder Patienten, das stets als Negativkontrolle mituntersucht wurde, ließ sich für keines der Gene eine Methylierung nachweisen. Somit konnten falsch positive Methylierungsergebnisse durch sich im Gewebe befindende Leukozyten ausgeschlossen werden.

Was die Übereinstimmung der Methylierung in den drei verschiedenen Gewebetypen pro Patient anbelangt, ließen sich folgende Ergebnisse erzielen:

Von den drei Patienten mit positiver Methylierung von MGMT im Tumor zeigte sich lediglich bei einem auch in der Lunge diese Veränderung und zwar in deutlich stärkerer Ausprägung als im zugehörigen Malignom. Bei zwei Patienten war das Bronchialgewebe methyliert, nicht jedoch andere Gewebetypen (siehe Tabelle 9.4 im Anhang).

RASSF1A war bei 11 Patienten im Tumor methyliert, jedoch nicht im Bronchus- oder Lungengewebe. In dem einen Fall mit positiver Methylierung des Bronchialepithels waren wiederum die beiden anderen Gewebetypen nicht von dieser Veränderung betroffen (siehe Tabelle 9.5 im Anhang).

In Bezug auf RASAL1 fand sich bei zwei Patienten eine Methylierung, wovon einer diese Veränderung auch im Lungengewebe aufwies (siehe Tabelle 9.6 im Anhang).

TUSC3 war bei neun Personen ausschließlich im Tumor methyliert, jedoch stand in sechs Fällen kein Bronchusgewebe zur Analyse zur Verfügung. Auch Lungen- (5 Fälle, 2 davon ohne Bronchusanalyse) und Bronchialgewebe (6 Fälle) wiesen teilweise isoliert eine Methylierung auf. Bei fünf Erkrankten ließ sich in allen drei Gewebetypen, bei acht Patienten sowohl im Tumor als auch im Bronchialepithel diese Veränderung nachweisen. Bei den drei Personen mit Methylierung im Lungen- und Tumorgewebe konnte aufgrund von Materialmangel keine Bronchusanalyse durchgeführt werden (siehe Tabelle 9.7 im Anhang).

Bei fünf Patienten waren gleichzeitig zwei Gene im Tumorgewebe methyliert. Ein Proband wies sowohl in Lungen- als auch Tumorgewebe eine Methylierung von jeweils drei Genen auf, wobei in diesem Fall für die Untersuchung von Bronchialepithel kein Material zur Verfügung stand. Insgesamt war bei 12 Patienten in Bronchus-, Tumor- oder Lungengewebe mehr als ein Gen von dieser epigenetischen Veränderung betroffen (siehe Tabelle 9.8. im Anhang).

### 5.3 Korrelation des Methylierungsstatus mit klinischen und pathologischen Parametern

Der Methylierungsstatus wurde zu den klinischen Parametern Geschlecht, Alter, Überleben und Nikotinabusus sowie den pathologischen Parametern Tumorstadium, Lymphknotenbefall, Metastasierung, Differenzierungsgrad, R-Stadium, Histologie der Tumoren und Stadiengruppierung in Beziehung gesetzt. Als statistisches Verfahren wurde der zweiseitige exakte Test nach Fisher verwendet, dabei Ergebnisse mit einem p-Wert kleiner 0,05 als signifikant gewertet.

#### 5.3.1 Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Geschlecht

Bei keinem der vier Gene zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Methylierungsstatus und dem Geschlecht. Lediglich im Bronchialepithel war TUSC3 bei Männern (77,3%) deutlich häufiger methyliert als bei Frauen (33,3%), jedoch verfehlte dieser Zusammenhang das Signifikanzniveau knapp ( $p = 0,064$ ).

	Bronchus			Lunge			Tumor		
	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>
MGMT									
Männlich	9,1	2/22	1,000	3,0	1/33	1,000	9,1	3/33	1,000
Weiblich	0,0	0/6		0,0	0/9		0,0	0/9	
RASSF1a									
Männlich	4,3	1/23	1,000	0,0	0/33	-	24,2	8/33	0,676
Weiblich	0,0	0/6		0,0	0/9		33,3	3/9	
RASAL1									
Männlich	0,0	0/21	-	3,0	1/33	1,000	6,1	2/33	1,000
Weiblich	0,0	0/6		0,0	0/9		0,0	0/9	
TUSC3									
Männlich	77,3	17/22	0,064	36,4	12/33	0,232	60,6	20/33	1,000
Weiblich	33,3	2/6		11,1	1/9		55,6	5/9	

1) zweiseitiger exakter Test nach Fisher

**Tabelle 5.12** Methylierungsstatus und Geschlecht

### 5.3.2 Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Alter

Je nach Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wurden die Patienten in zwei Altersgruppen eingeteilt ( $\leq 60$  Jahre oder  $> 60$  Jahre).

Zwischen dem Alter der Patienten und dem Methylierungsstatus sämtlicher Gene ließ sich kein signifikanter Zusammenhang feststellen, jedoch war vor allem im Bronchus TUSC3 bei den über Sechzigjährigen häufiger methyliert als in der Gruppe der jüngeren Studienteilnehmer. Im Tumorgewebe ließ sich dieser Effekt deutlich weniger ausgeprägt beobachten.

	Bronchus			Lunge			Tumor		
	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>
MGMT									
≤ 60 Jahre	11,1	2/18	0,524	4,3	1/23	1,000	8,7	2/23	1,000
> 60 Jahre	0,0	0/10		0,0	0/19		5,3	1/19	
RASSF1A									
≤ 60 Jahre	0,0	0/18	0,379	0,0	0/23	-	26,1	6/23	1,000
> 60 Jahre	9,1	1/11		0,0	0/19		26,3	5/19	
RASAL1									
≤ 60 Jahre	0,0	0/17	-	4,3	1/23	1,000	8,7	2/23	0,492
> 60 Jahre	0,0	0/10		0,0	0/19		0,0	0/19	
TUSC3									
≤ 60 Jahre	58,8	10/17	0,249	30,4	7/23	1,000	56,5	13/23	0,757
> 60 Jahre	81,8	9/11		31,6	6/19		63,2	12/19	

1) zweiseitiger exakter Test nach Fisher

**Tabelle 5.13 Methylierungsstatus und Alter**

### 5.3.3 Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Überleben

Bei der Korrelation von Überleben und Methylierung konnte für die Gene MGMT, RASSF1A und RASAL1 kein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. TUSC3 bildet hier eine Ausnahme. Unter den Überlebenden fand sich im Tumorgewebe signifikant häufiger eine Methylierung dieses Gens als unter den im Beobachtungsintervall verstorbenen Patienten ( $p = 0,039$ ). Eine ähnliche Tendenz ließ sich für die Methylierung von TUSC3 im Lungengewebe und weniger im Bronchialgewebe beobachten, allerdings ohne statistische Signifikanz.

	Bronchus			Lunge			Tumor		
	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>
MGMT									
Lebend	12,5	1/8	0,497	0,0	0/13	1,000	7,7	1/13	1,000
Verstorben	5,0	1/20		3,6	1/28		7,1	2/28	
RASSF1A									
Lebend	0,0	0/9	1,000	0,0	0/13	-	15,4	2/13	0,451
Verstorben	5,0	1/20		0,0	0/28		32,1	9/28	
RASAL1									
Lebend	0,0	0/8	-	0,0	0/13	1,000	0,0	0/13	1,000
Verstorben	0,0	0/19		3,6	1/28		7,1	2/28	
TUSC3									
Lebend	77,8	7/9	0,670	46,2	6/13	0,280	84,6	11/13	0,039
Verstorben	63,2	12/19		25,0	7/28		46,4	13/28	

1) zweiseitiger exakter Test nach Fisher

**Tabelle 5.14 Methylierungsstatus und Überleben**

### 5.3.4 Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Nikotinabusus

Zwischen dem Methylierungsstatus und dem Nikotinabusus konnte für keines der Gene ein statistisch signifikanter Zusammenhang hergestellt werden. Bei MGMT und RASAL1 trat eine Methylierung ausschließlich bei Rauchern auf, wohingegen bei TUSC3 in Lungen- und Tumor- und bei RASSF1A in Tumorgewebe auch bei Nichtrauchern positive Methylierungswerte nachweisbar waren.

	Bronchus			Lunge			Tumor		
	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>
MGMT									
Nichtraucher	0,0	0/2	1,000	0,0	0/5	1,000	0,0	0/5	1,000
Raucher	7,7	2/26		2,7	1/37		8,1	3/37	
RASSF1A									
Nichtraucher	0,0	0/2	1,000	0,0	0/5	-	40,0	2/5	0,593
Raucher	3,7	1/27		0,0	0/37		24,3	9/37	
RASAL1									
Nichtraucher	0,0	0/2	-	0,0	0/5	1,000	0,0	0/5	1,000
Raucher	0,0	0/27		2,7	1/37		5,4	2/37	
TUSC3									
Nichtraucher	0,0	0/2	0,095	40,0	2/5	0,637	60,0	3/5	1,000
Raucher	73,1	19/26		29,7	11/37		59,5	22/37	

1) zweiseitiger exakter Test nach Fisher

**Tabelle 5.15 Methylierungsstatus und Nikotinabusus**

### 5.3.5 Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Primärtumor T

In der 7. Auflage der TNM-Klassifikation von 2010 (Wittekind, Meyer, 2010) wurden die Primärtumorstadien T1 und T2 nochmals in a und b untergliedert. In Tabelle 5.16 findet sich die statistische Auswertung nach übergeordneten T-Stadien, Tabelle 5.17 gibt die detaillierte Auswertung mit Untergliederung der Stadien T1 und T2 in a und b wieder.

Während bei der Korrelation von einfachen T-Stadien mit dem Methylierungsstatus für keines der Gene ein signifikanter Zusammenhang hergestellt werden konnte, fand sich bei der Auswertung mit detaillierten Tumorstadien ein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,005$ ) zwischen der T-Stadienverteilung und der Methylierung der Promotorregion von

TUSC3 im Tumorgewebe. Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich, wenn die Stadien T1a, T1b und T2a sowie T2b, T3 und T4 zu Gruppen zusammengefasst werden: Tumorgewebe der niedrigeren T-Stadien T1a, T1b und T2a war signifikant häufiger von einer Methylierung der Promotorregion von TUSC3 betroffen als das der höheren Stadien T2b, T3 und T4 ( $p = 0,008$ ). Für die Zusammenfassung der einfachen T-Stadien T1/T2 versus T3/T4 konnte dieser Zusammenhang nicht festgestellt werden ( $p = 0,235$ ).

	Bronchus			Lunge			Tumor		
	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>
<b>MGMT</b>									
T1	0,0	0/4	0,640	10,0	1/10	0,429	10,0	1/10	1,000
T2	5,9	1/17		0,0	0/24		8,3	2/24	
T3	0,0	0/3		0,0	0/3		0,0	0/3	
T4	25,0	1/4		0,0	0/5		0,0	0/5	
<b>RASSF1A</b>									
T1	0,0	0/5	1,000	0,0	0/10	-	30,0	3/10	0,585
T2	5,9	1/17		0,0	0/24		29,2	7/24	
T3	0,0	0/3		0,0	0/3		33,3	1/3	
T4	0,0	0/4		0,0	0/5		0,0	0/5	
<b>RASAL1</b>									
T1	0,0	0/4	-	10,0	1/10	0,429	10,0	1/10	0,679
T2	0,0	0/16		0,0	0/24		4,2	1/24	
T3	0,0	0/3		0,0	0/3		0,0	0/3	
T4	0,0	0/4		0,0	0/5		0,0	0/5	
<b>TUSC3</b>									
T1	60,0	3/5	0,244	40,0	4/10	0,685	60,0	6/10	0,532
T2	81,3	13/16		33,3	8/24		66,7	16/24	
T3	33,3	1/3		0,0	0/3		33,3	1/3	
T4	50,0	2/4		20,0	1/5		40,0	2/5	

1) zweiseitiger exakter Test nach Fisher

**Tabelle 5.16** Methylierungsstatus und Primärtumor T, einfach

	Bronchus			Lunge			Tumor		
	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>
<b>MGMT</b>									
T1a	0,0	0/2	0,696	12,5	1/8	0,619	12,5	1/8	1,000
T1b	0,0	0/2		0,0	0/2		0,0	0/2	
T2a	10,0	1/10		0,0	0/16		6,3	1/16	
T2b	0,0	0/7		0,0	0/8		12,5	1/8	
T3	0,0	0/3		0,0	0/3		0,0	0/3	
T4	25,0	1/4		0,0	0/5		0,0	0/5	
<b>RASSF1A</b>									
T1a	0,0	0/3	1,000	0,0	0/8	-	25,0	2/8	0,322
T1b	0,0	0/2		0,0	0/2		50,0	1/2	
T2a	10,0	1/10		0,0	0/16		18,8	3/16	
T2b	0,0	0/7		0,0	0/8		50,0	4/8	
T3	0,0	0/3		0,0	0/3		33,3	1/3	
T4	0,0	0/4		0,0	0/5		0,0	0/5	
<b>RASAL1</b>									
T1a	0,0	0/2	-	12,5	1/8	0,619	12,5	1/8	0,470
T1b	0,0	0/2		0,0	0/2		0,0	0/2	
T2a	0,0	0/10		0,0	0/16		0,0	0/16	
T2b	0,0	0/6		0,0	0/8		12,5	1/8	
T3	0,0	0/3		0,0	0/3		0,0	0/3	
T4	0,0	0/4		0,0	0/5		0,0	0/5	
<b>TUSC3</b>									
T1a	100,0	3/3	0,106	25,0	2/8	0,389	75,0	6/8	0,005
T1b	0,0	0/2		100,0	2/2		0,0	0/2	
T2a	80,0	8/10		31,3	5/16		87,5	14/16	
T2b	83,3	5/6		37,5	3/8		25,0	2/8	
T3	33,3	1/3		0,0	0/3		33,3	1/3	
T4	50,0	2/4		20,0	1/5		40,0	2/5	

1) zweiseitiger exakter Test nach Fisher

**Tabelle 5.17** Methylierungsstatus und Primärtumor T, detailliert



### 5.3.6 Korrelation zwischen Methylierungsstatus und N-Stadium

Zwischen dem Lymphknotenbefall und der Promotormethylierung wies keines der untersuchten Gene einen signifikanten Zusammenhang auf.

	Bronchus			Lunge			Tumor		
	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>
<b>MGMT</b>									
N0	11,1	2/18		0,0	0/28		3,6	1/28	
N1	0,0	0/8	1,000	9,1	1/11	0,333	18,2	2/11	0,352
N2	0,0	0/2		0,0	0/3		0,0	0/3	
<b>RASSF1A</b>									
N0	0,0	0/19		0,0	0/28		25,0	7/28	
N1	12,5	1/8	0,345	0,0	0/11	-	27,3	3/11	1,000
N2	0,0	0/2		0,0	0/3		33,3	1/3	
<b>RASAL1</b>									
N0	0,0	0/17		0,0	0/28		3,6	1/28	
N1	0,0	0/8	-	9,1	1/11	0,333	9,1	1/11	0,561
N2	0,0	0/2		0,0	0/3		0,0	0/3	
<b>TUSC3</b>									
N0	77,8	14/18		32,1	9/28		64,3	18/28	
N1	50,0	4/8	0,270	18,2	2/11	0,213	45,5	5/11	0,609
N2	50,0	1/2		66,7	2/3		66,7	2/3	

1) zweiseitiger exakter Test nach Fisher

**Tabelle 5.18 Methylierungsstatus und N-Stadium**

### 5.3.7 Korrelation zwischen Methylierungsstatus und M-Stadium

Auch zwischen der Fernmetastasierung und dem Methylierungsstatus der Gene ließ sich kein signifikanter Zusammenhang nachweisen.

	Bronchus			Lunge			Tumor		
	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>
MGMT									
M0	7,7	2/26	1,000	2,6	1/38	1,000	7,9	3/38	1,000
M1	0,0	0/2		0,0	0/3		0,0	0/3	
RASSF1A									
M0	3,7	1/27	1,000	0,0	0/38	-	26,3	10/38	1,000
M1	0,0	0/2		0,0	0/3		33,3	1/3	
RASAL1									
M0	0,0	0/25	-	2,6	1/38	1,000	5,3	2/38	1,000
M1	0,0	0/2		0,0	0/3		0,0	0/3	
TUSC3									
M0	73,1	19/26	0,095	28,9	11/38	0,232	60,5	23/38	0,560
M1	0,0	0/2		66,7	2/3		33,3	1/3	

1) zweiseitiger exakter Test nach Fisher

**Tabelle 5.19 Methylierungsstatus und Fernmetastasierung**

### 5.3.8 Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Grading

Der Differenzierungsgrad der Tumoren korrelierte bei keinem der untersuchten Gene signifikant mit dem Methylierungsstatus.

	Bronchus			Lunge			Tumor		
	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>
MGMT									
G2	6,7	1/15	1,000	4,2	1/24	1,000	4,2	1/24	0,567
G3	7,7	1/13		0,0	0/18		11,1	2/18	
RASSF1A									
G2	0,0	0/16	0,448	0,0	0/24	-	25,0	6/24	1,000
G3	7,7	1/13		0,0	0/18		27,8	5/18	
RASAL1									
G2	0,0	0/15	-	4,2	1/24	1,000	8,3	2/24	0,498
G3	0,0	0/12		0,0	0/18		0,0	0/18	
TUSC3									
G2	68,8	11/16	1,000	29,2	7/24	1,000	62,5	15/24	0,775
G3	66,7	8/12		33,3	6/18		55,6	10/18	

1) zweiseitiger exakter Test nach Fisher

**Tabelle 5.20 Methylierungsstatus und Grading**

### 5.3.9 Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Residualtumor

Mit Ausnahme der Promotormethylierung von TUSC3 im Tumorgewebe ( $p = 0,021$ ) ergab sich keinerlei signifikanter Zusammenhang mit dem Residualtumorstadium. Bei TUSC3 waren ausschließlich Tumorfälle methyliert, die in sano reseziert werden konnten.

	Bronchus			Lunge			Tumor		
	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>
<b>MGMT</b>									
R0	7,7	2/26		2,6	1/38		5,3	2/38	
R1	0,0	0/1	1,000	0,0	0/3	1,000	33,3	1/3	0,265
R2	0,0	0/1		0,0	0/1		0,0	0/1	
<b>RASSF1A</b>									
R0	3,8	1/26		0,0	0/38		28,9	11/38	
R1	0,0	0/1	<sup>2</sup>	0,0	0/3	-	0,0	0/3	0,669
R2	0,0	0/1		0,0	0/1		0,0	0/1	
<b>RASAL1</b>									
R0	0,0	0/25		2,6	1/38		5,3	2/38	
R1	0,0	0/1	-	0,0	0/3	1,000	0,0	0/3	1,000
R2	0,0	0/1		0,0	0/1		0,0	0/1	
<b>TUSC3</b>									
R0	69,2	18/26		28,9	11/38		65,8	25/38	
R1	100,0	1/1	0,548	33,3	1/3	0,470	0,0	0/3	<b>0,021</b>
R2	0,0	0/1		100,0	1/1		0,0	0/1	

1) zweiseitiger exakter Test nach Fisher

2) keine Berechnung möglich

**Tabelle 5.21 Methylierungsstatus und Residualtumor**

### 5.3.10 Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Histologie

Zwischen der Tumorphistologie und dem Methylierungsstatus ließ sich ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang feststellen.

	Bronchus			Lunge			Tumor		
	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>5)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>5)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>5)</sup>
<b>MGMT</b>									
AC <sup>1)</sup>	9,1	1/11	0,167	0,0	0/17	1,000	0,0	0/17	0,090
PECA <sup>2)</sup>	0,0	0/13		5,0	1/20		10,0	2/20	
GCCA <sup>3)</sup>	33,3	1/3		0,0	0/3		0,0	0/3	
NECA <sup>4)</sup>	0,0	0/1		0,0	0/2		50,0	1/2	
<b>RASSF1A</b>									
AC <sup>1)</sup>	0,0	0/11	1,000	0,0	0/17	-	35,3	6/17	0,427
PECA <sup>2)</sup>	7,1	1/14		0,0	0/20		20,0	4/20	
GCCA <sup>3)</sup>	0,0	0/3		0,0	0/3		0,0	0/3	
NECA <sup>4)</sup>	0,0	0/1		0,0	0/2		50,0	1/2	
<b>RASAL1</b>									
AC <sup>1)</sup>	0,0	0/11	-	0,0	0/17	1,000	0,0	0/17	0,605
PECA <sup>2)</sup>	0,0	0/12		5,0	1/20		10,0	2/20	
GCCA <sup>3)</sup>	0,0	0/3		0,0	0/3		0,0	0/3	
NECA <sup>4)</sup>	0,0	0/1		0,0	0/2		0,0	0/2	
<b>TUSC3</b>									
AC <sup>1)</sup>	54,5	6/11	0,744	17,6	3/17	0,234	70,6	12/17	0,594
PECA <sup>2)</sup>	76,9	10/13		45,0	9/20		55,0	11/20	
GCCA <sup>3)</sup>	66,7	2/3		33,3	1/3		33,3	1/3	
NECA <sup>4)</sup>	100,0	1/1		0,0	0/2		50,0	1/2	

- 1) Adenokarzinom
- 2) Plattenepithelkarzinom
- 3) großzelliges Karzinom
- 4) neuroendokrines Karzinom
- 5) zweiseitiger exakter Test nach Fisher

**Tabelle 5.22 Methylierungsstatus und Histologie**

### 5.3.11 Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Stadien- gruppierung

Bei der Untersuchung der einfachen Stadiengruppierungen ergab sich lediglich im Bronchialgewebe bei TUSC3 ein signifikantes Ergebnis ( $p = 0,041$ ). Zudem wies die Kombination des Bronchusgewebes der niedrigeren Stadien I und II häufiger eine Methylierung der Promotorregion dieses Gens auf als die der höheren Stadien III und IV ( $p = 0,035$ ).

Die Auswertung der detailliert aufgegliederten Erkrankungsstadien zeigte für keines der Gene eine Signifikanz.

	Bronchus			Lunge			Tumor		
	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>
MGMT									
I	9,1	1/11	1,000	0,0	0/19	0,537	5,3	1/19	0,444
II	0,0	0/7		10,0	1/10		20,0	2/10	
III	12,5	1/8		0,0	0/9		0,0	0/9	
IV	0,0	0/2		0,0	0/3		0,0	0/3	
RASSF1A									
I	0,0	0/12	0,310	0,0	0/19	-	21,1	4/19	0,725
II	14,3	1/7		0,0	0/10		40,0	4/10	
III	0,0	0/8		0,0	0/9		22,2	2/9	
IV	0,0	0/2		0,0	0/3		33,3	1/3	
RASAL1									
I	0,0	0/11	-	0,0	0/19	0,537	0,0	0/19	0,172
II	0,0	0/6		10,0	1/10		20,0	2/10	
III	0,0	0/8		0,0	0/9		0,0	0/9	
IV	0,0	0/2		0,0	0/3		0,0	0/3	
TUSC3									
I	75,0	9/12	0,041	31,6	6/19	0,636	78,9	15/19	0,079
II	100,0	6/6		30,0	3/10		40,0	4/10	
III	50,0	4/8		22,2	2/9		44,4	4/9	
IV	0,0	0/2		66,7	2/3		33,3	1/3	

1) zweiseitiger exakter Test nach Fisher

**Tabelle 5.23 Methylierungsstatus und Stadiengruppierung, einfach**

	Bronchus			Lunge			Tumor		
	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	p <sup>1)</sup>
<b>MGMT</b>									
IA	0,0	0/3		0,0	0/8		0,0	0/8	
IB	12,5	1/8		0,0	0/11		9,1	1/11	
IIA	0,0	0/6		11,1	1/9		11,1	1/9	
IIB	0,0	0/1	1,000	0,0	0/1	0,738	100,0	1/1	0,176
IIIA	12,5	1/8		0,0	0/9		0,0	0/9	
IIIB	0,0	0/0		0,0	0/0		0,0	0/0	
IV	0,0	0/2		0,0	0/3		0,0	0/3	
<b>RASSF1A</b>									
IA	0,0	0/4		0,0	0/8		25,0	2/8	
IB	0,0	0/8		0,0	0/11		18,2	2/11	
IIA	16,7	1/6		0,0	0/9		33,3	3/9	
IIB	0,0	0/1	0,448	0,0	0/1	-	100,0	1/1	0,779
IIIA	0,0	0/8		0,0	0/9		22,2	2/9	
IIIB	0,0	0/0		0,0	0/0		0,0	0/0	
IV	0,0	0/2		0,0	0/3		33,3	1/3	
<b>RASAL1</b>									
IA	0,0	0/3		0,0	0/8		0,0	0/8	
IB	0,0	0/8		0,0	0/11		0,0	0/11	
IIA	0,0	0/5		11,1	1/9		22,2	2/9	
IIB	0,0	0/1	-	0,0	0/1	0,738	0,0	0/1	0,343
IIIA	0,0	0/8		0,0	0/9		0,0	0/9	
IIIB	0,0	0/0		0,0	0/0		0,0	0/0	
IV	0,0	0/2		0,0	0/3		0,0	0/3	
<b>TUSC3</b>									
IA	75,0	3/4		25,0	2/8		62,5	5/8	
IB	75,0	6/8		36,4	4/11		90,9	10/11	
IIA	100,0	5/5		33,3	3/9		44,4	4/9	
IIB	100,0	1/1	0,134	0,0	0/1	0,872	0,0	0/1	0,102
IIIA	50,0	4/8		22,2	2/9		44,4	4/9	
IIIB	0,0	0/0		0,0	0/0		0,0	0/0	
IV	0,0	0/2		66,7	2/3		33,3	1/3	

1) zweiseitiger exakter Test nach Fisher

**Tabelle 5.24 Methylierungsstatus und Stadiengruppierung, detailliert**

## 5.4 Überlebensfunktionen nach Kaplan-Meier

Schließlich wurden sämtliche klinischen und pathologischen Parameter im Hinblick auf die Überlebenszeit, die von 41 Patienten bekannt war, untersucht. Für die Schätzung der Überlebensfunktionen wurde das Verfahren nach Kaplan-Meier angewendet und das Signifikanz-Niveau mittels des Logrank-Tests berechnet. Auch hier galt ein p-Wert kleiner 0,05 als signifikant.

Die Auswertung ließ keinen signifikanten Zusammenhang der Überlebenszeit mit den Parametern „Geschlecht ( $p = 0,864$ ), Nikotinabusus ( $p = 0,322$ ), Tumorhistologie ( $p = 0,788$ ) und Differenzierungsgrad ( $p = 0,301$ )“ erkennen. Der Parameter „einfaches Tumorstadium T ( $p = 0,075$ )“ verfehlte das Signifikanzniveau knapp.

Die Promotormethylierung der Gene MGMT ( $p = 0,972$ ), RASSF1A ( $p = 0,417$ ) und RASAL1 ( $p = 0,372$ ) im Tumorgewebe wirkte sich ebenfalls nicht signifikant auf das Überleben der Patienten aus.

Dagegen korrelierte die Überlebenszeit signifikant mit dem Erkrankungsalter ( $\leq 60$  Jahre,  $> 60$  Jahre;  $p = 0,034$ ), dem detaillierten Tumorstadium T ( $p = 0,019$ ), dem Lymphknotenbefall N ( $p = 0,000$ ), der Fernmetastasierung M ( $p = 0,000$ ), dem einfachen ( $p = 0,000$ ) und detaillierten Erkrankungsstadium ( $p = 0,000$ ) sowie dem R-Status ( $p = 0,017$ ). Zudem lebten Patienten mit Methylierung von TUSC3 im Tumorgewebe signifikant länger als diejenigen, die keine Methylierung der Promotorregion aufwiesen ( $p = 0,013$ ). Im Folgenden sind die Überlebenskurven mit signifikantem Ergebnis dargestellt (Abbildungen 5.1 bis 5.8). Die beigelegten Tabellen 5.25 bis 5.32 sollen das Überleben in Abhängigkeit vom untersuchten Merkmal zusätzlich verdeutlichen.



### 5.4.1 Überleben in Abhängigkeit vom Alter zum Diagnosezeitpunkt

Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnose 60 Jahre oder jünger waren, zeigten ein signifikant geringeres Überleben als Patienten, bei denen sich die Erkrankung erst nach dem 60. Lebensjahr manifestierte (Abbildung 5.4).

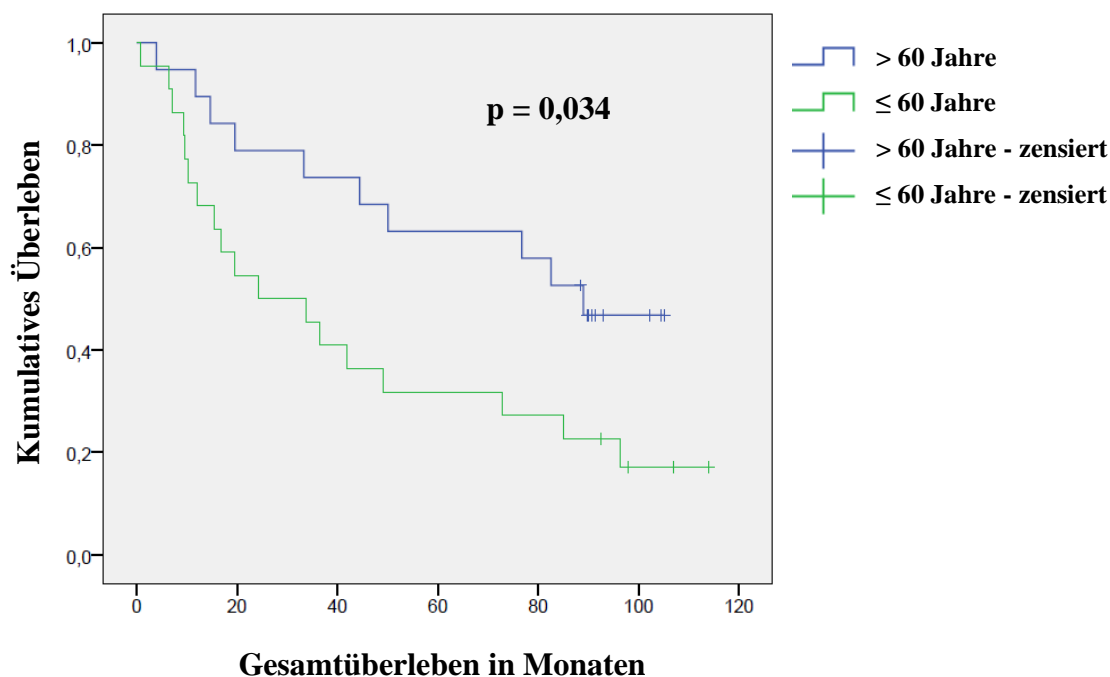


Abbildung 5.4 Überleben in Abhängigkeit vom Alter bei Diagnose

Lediglich 18,2 Prozent der jüngeren, jedoch 47,4 Prozent der älteren Betroffenen überlebten den Beobachtungszeitraum (Tabelle 5.25).

Alter bei Diagnose	verstorben		lebend	
	n/n <sub>gesamt</sub>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	%
≤ 60 Jahre	18/22	81,8	4/22	18,2
> 60 Jahre	10/19	52,6	9/19	47,4

Tabelle 5.25 Überleben in Abhängigkeit vom Alter bei Diagnose

### 5.4.2 Überleben in Abhängigkeit vom Tumorstadium T, detailliert

Zwischen dem Primärtumorstadium T und dem Überleben der Patienten ließ sich auf einem Signifikanzniveau von  $p = 0,019$  ein Zusammenhang darstellen (Abbildung 5.5).

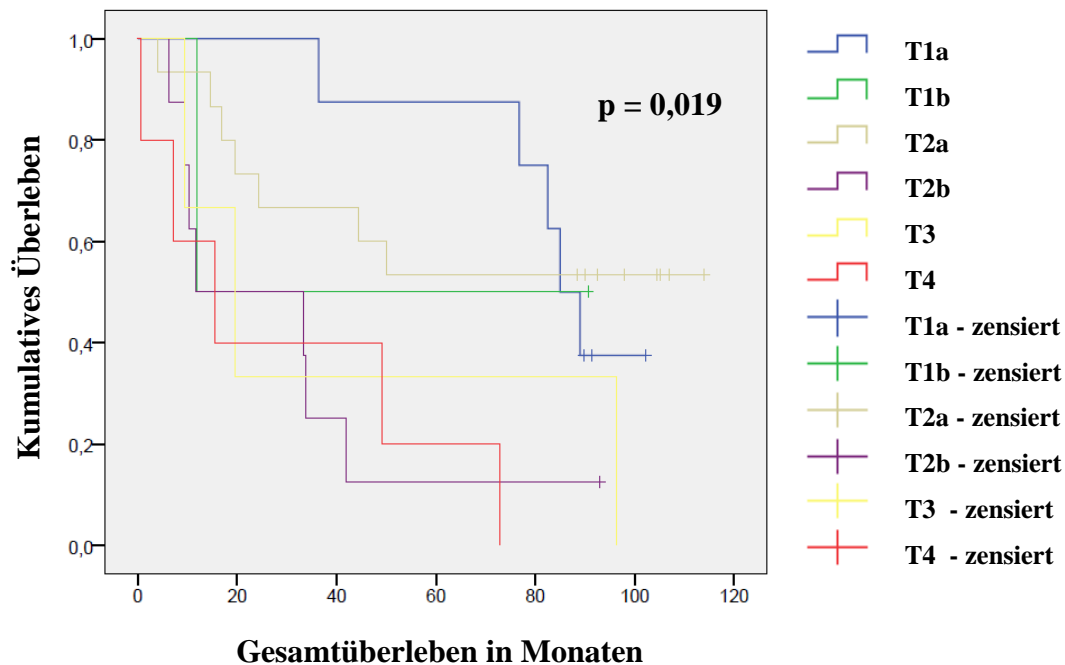


Abbildung 5.5 Überleben in Abhängigkeit vom Primärtumor T, detailliert

Es überlebten ausschließlich Patienten, bei denen ein Primärtumor der Stadien T1 oder T2 vorlag, den Beobachtungszeitraum (Tabelle 5.26).

Primärtumor T	verstorben		lebend	
	n/n <sub>gesamt</sub>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	%
T1a	5/8	62,5	3/8	37,5
T1b	1/2	50,0	1/2	50,0
T2a	7/15	46,7	8/15	53,3
T2b	7/8	87,5	1/8	12,5
T3	3/3	100,0	0/3	0,0
T4	5/5	100,0	0/3	0,0

Tabelle 5.26 Überleben in Abhängigkeit vom Primärtumor T, detailliert

### 5.4.3 Überleben in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall

Zwischen dem Befall regionärer Lymphknoten und dem Überleben der Erkrankten fand sich ein hochsignifikanter Zusammenhang (Abbildung 5.6).

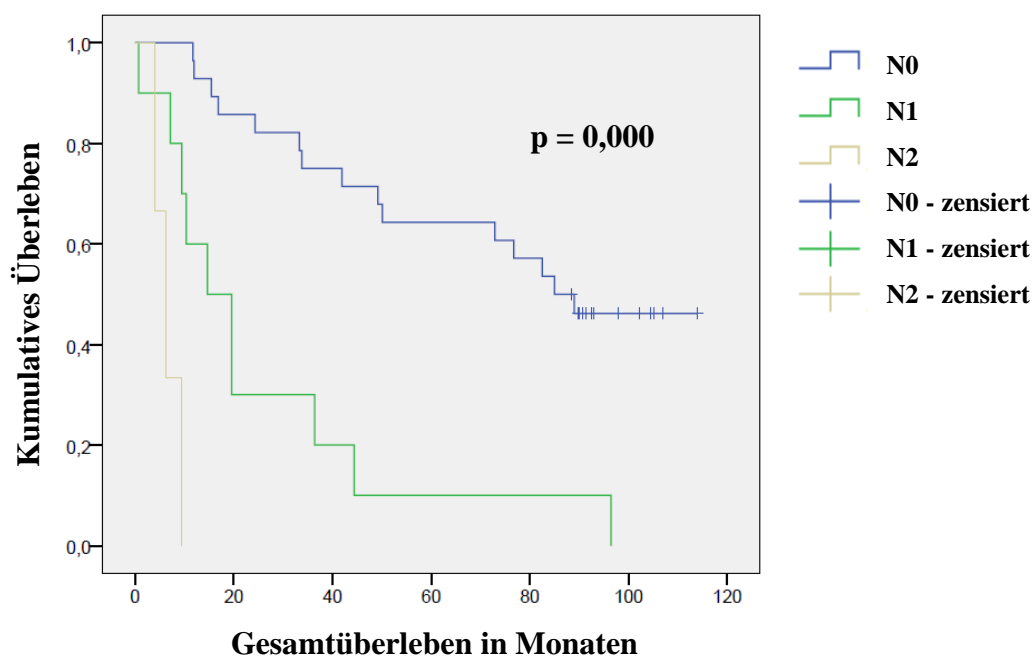


Abbildung 5.6 Überleben in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall

Zum Zeitpunkt der letzten Datenerhebung waren bereits alle Patienten mit positivem Lymphknotenstatus verstorben, während 46,4 Prozent der Patienten mit negativem Nodalstatus lebten (Tabelle 5.27).

Regionäre Lymphknoten N	verstorben		lebend	
	n/n <sub>gesamt</sub>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	%
N0	15/28	53,6	13/28	46,4
N1	10/10	100,0	0/10	0,0
N2	3/3	100,0	0/3	0,0

Tabelle 5.27 Überleben in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall

### 5.4.4 Überleben in Abhängigkeit von der Fernmetastasierung

Die drei Patienten, bei denen bereits bei Erstdiagnose eine Fernmetastasierung vorlag, verstarben ebenfalls deutlich früher. Auch dieses Ergebnis war statistisch hochsignifikant (Abbildung 5.7).

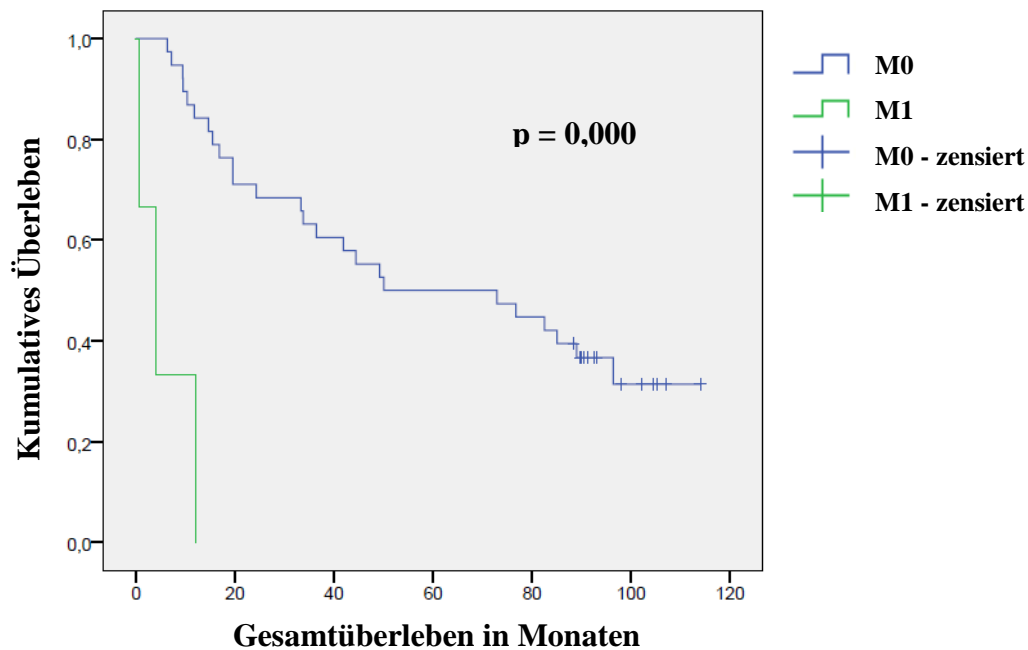


Abbildung 5.7 Überleben in Abhängigkeit von der Fernmetastasierung

Von den 13 Überlebenden dieser Studie wies niemand eine Fernmetastasierung auf.

Fernmetastasierung M	verstorben		lebend	
	n/n <sub>gesamt</sub>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	%
M0	25/38	65,8	13/38	34,2
M1	3/3	100,0	0/3	0,0

Tabelle 5.28 Überleben in Abhängigkeit von der Fernmetastasierung

### 5.4.5 Überleben in Abhängigkeit vom Erkrankungsstadium

Sowohl bei der Auswertung des einfachen als auch des detaillierten Erkrankungsstadiums fand sich ein hochsignifikanter Zusammenhang in Bezug auf das Überleben der Erkrankten. Abbildung 5.8 zeigt die Überlebenskurve für die einfache, Abbildung 5.9 für die detaillierte Stadiengruppierung. Tabellen 5.29 und 5.30 geben die genauen Überlebensdaten wieder. Demnach hatten fast nur Patienten, bei denen das Tumorleiden im Stadium 1 diagnostiziert wurde, eine Überlebenschance. Lediglich ein Betroffener mit Stadium 2A überlebte den Beobachtungszeitraum.

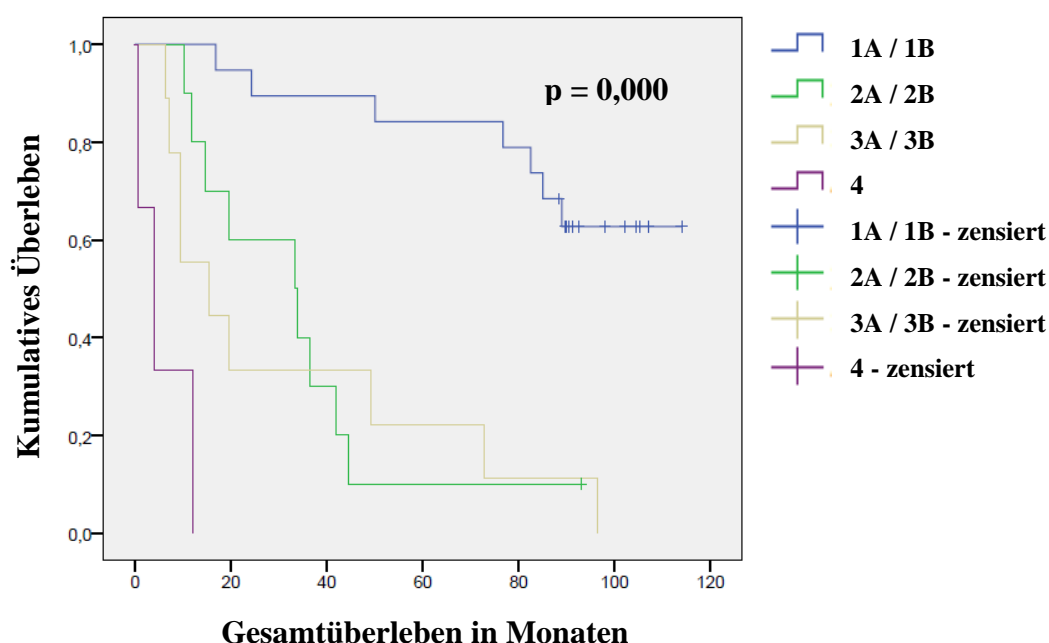


Abbildung 5.8 Überleben in Abhängigkeit von der Stadiengruppierung, einfach

Stadiengruppierung, einfach	verstorben		lebend	
	n/n <sub>gesamt</sub>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	%
1	7/19	36,8	12/19	63,2
2	9/10	90,0	1/10	10,0
3	9/9	100,0	0/9	0,0
4	3/3	100,0	0/3	0,0

Tabelle 5.29 Überleben in Abhängigkeit von der Stadiengruppierung, einfach

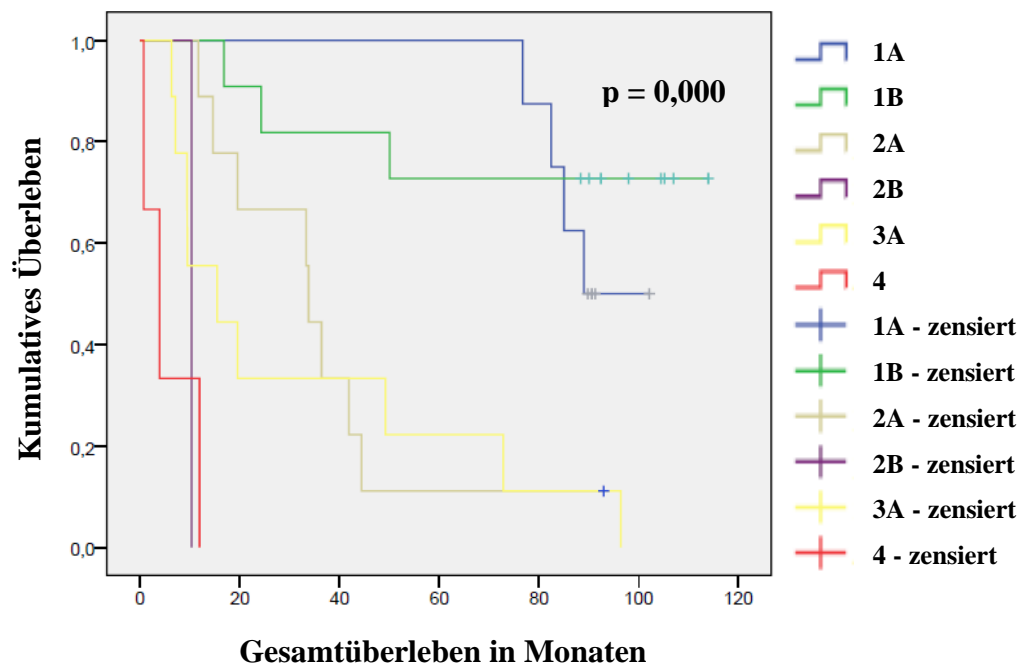


Abbildung 5.9 Überleben in Abhängigkeit von der Stadiengruppierung, detailliert

Stadiengruppierung, detailliert	verstorben		lebend	
	n/n <sub>gesamt</sub>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	%
1A	4/8	50,0	4/8	50,0
1B	3/11	27,3	8/11	72,7
2A	8/9	88,9	1/9	11,1
2B	1/1	100,0	0/1	0,0
3	9/9	100,0	0/9	0,0
4	3/3	100,0	0/3	0,0

Tabelle 5.30 Überleben in Abhängigkeit von der Stadiengruppierung, detailliert

### 5.4.6 Überleben in Abhängigkeit vom Residualtumor

Es fand sich zudem ein signifikanter Zusammenhang zwischen der vollständigen Entfernung des Karzinoms im Gesunden beziehungsweise des Ausmaßes des Vorhandensein von Resttumorgewebe und dem Überleben der Patienten (Abbildung 5.10)

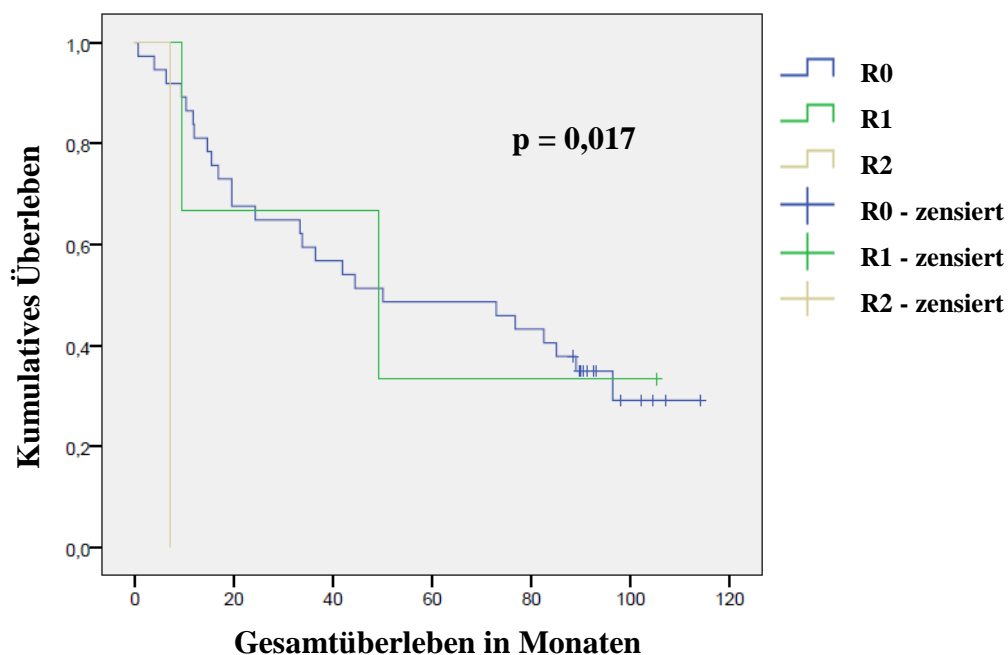


Abbildung 5.10 Überleben in Abhängigkeit vom Residualtumor

Von den vier Patienten, bei denen keine Tumorresektion in sano möglich war, erlebte lediglich einer den Zeitpunkt der letzten Datenerhebung.

Residualtumor R	verstorben		lebend	
	n/n <sub>gesamt</sub>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	%
R0	25/37	67,6	12/37	32,4
R1	2/3	66,7	1/3	33,3
R2	1/1	100,0	0/1	0,0

Tabelle 5.31 Überleben in Abhängigkeit vom Residualtumor

### 5.4.7 Überleben in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus von TUSC3 im Tumorgewebe

Schließlich fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Methylierung der Promotorregion von TUSC3 im Tumor und dem Überleben der Erkrankten. Patienten mit positivem Methylierungsstatus für dieses Gen lebten länger als Patienten, bei denen sich keine Methylierung fand (Abbildung 5.11).

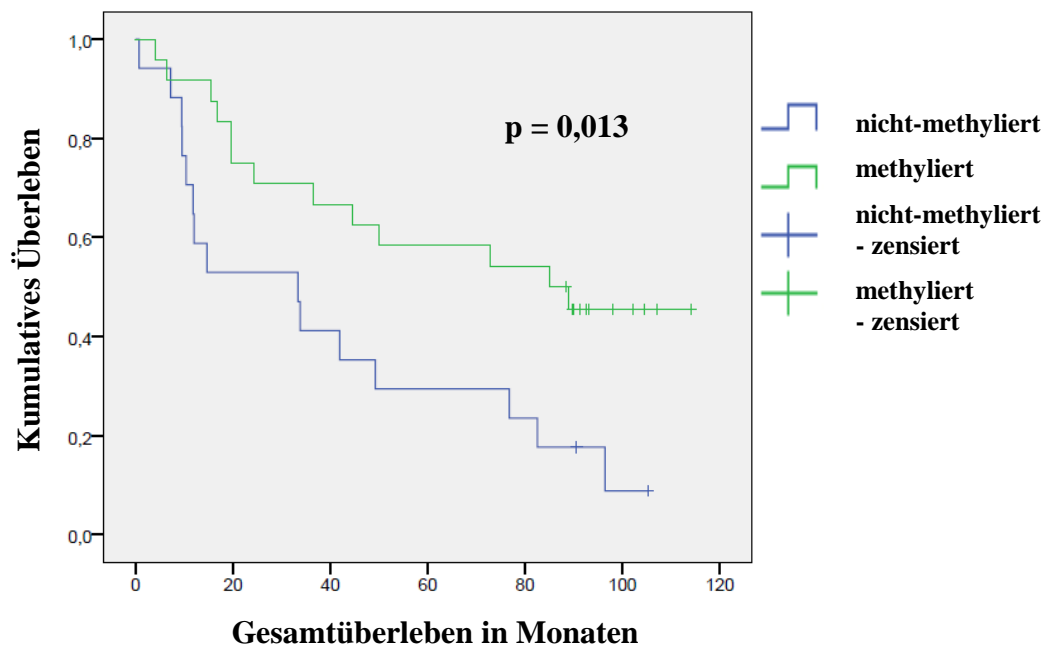


Abbildung 5.11 Überleben in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus von TUSC3 im Tumorgewebe

So verstarben 88,2 Prozent der Patienten, die keine Methylierung der Promotorregion von TUSC3 aufwiesen, jedoch lediglich 45,8 Prozent der Erkrankten mit positivem Methylierungsstatus (Tabelle 5.32).

Methylierungsstatus von TUSC3	verstorben		lebend	
	n/n <sub>gesamt</sub>	%	n/n <sub>gesamt</sub>	%
methyliert	13/24	54,2	11/24	45,8
nicht methyliert	15/17	88,2	2/17	11,8

Tabelle 5.32 Überleben in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus von TUSC3 im Tumorgewebe



## 6 Diskussion

In dieser Arbeit wurden sechs Gene auf ihren Methylierungsstatus hin beim Bronchialkarzinom sowie in dazugehörigem nicht-malignem Bronchus- und Lungengewebe untersucht und mit klinisch-pathologischen Parametern korreliert. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen im Folgenden unter Berücksichtigung der Forschungsliteratur zur Inaktivierung dieser Gene diskutiert werden.

### 6.1 Unterschiede in der Methylierungshäufigkeit zwischen Lungen- und Bronchusgewebe

Bei drei der untersuchten Gene fand sich im nicht-malignen Bronchusgewebe häufiger eine Methylierung als im Lungennormalgewebe, wobei dieser Effekt bei MGMT und RASSF1A bei durchaus geringen Methylierungsraten nur schwach ausgeprägt war: MGMT (7,1% (2/28) versus 2,4% (1/42)), RASSF1A (3,4% (1/29) versus 0% (0/42)) und TUSC3 (67,9% (10/28) versus 31% (13/42)). Ursächlich für diesen Sachverhalt dürfte die stärkere Exposition der Bronchialepithelien im Vergleich zu den weiter distal gelegenen Alveolen gegenüber inhalativen Noxen, wie sie beispielsweise im Tabakrauch zu finden sind, sein, die für die Entstehung dieser epigenetischen Veränderung mitverantwortlich gemacht werden (Yang et al., 2011). Lediglich bei RASAL1 (0% (0/27) versus 2,4% (1/42)) verhielt es sich umgekehrt, was aber auf die generell geringe Methylierungshäufigkeit dieses Gens in dieser Arbeit und die damit sehr begrenzte Aussagekraft zurückgeführt werden kann.

### 6.2 Untersuchte Gene

#### 6.2.1 O6-Methylguanine-DNA-Methyltransferase (MGMT)

Die Inaktivierung und damit der Expressionsverlust von MGMT ist häufig auf eine Methylierung seiner Promotorregion zurückzuführen (Watts et al., 1997; Danam et al., 1999; Esteller et al., 1999b; Danam et al., 2005). Diese wurde außer beim Lungenkarzinom für eine Vielzahl von Malignomen wie beispielsweise Hirn- und Hodentumoren sowie Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs, für das Kolon-, Blasen-, Magen-, Nieren- und Pankreaskarzinom, aber auch für das maligne Melanom und für Leukämien nachgewiesen (Esteller et al., 1999b; Smith-Sørensen et al., 2002: *Hoden*; Bae et al., 2002: *Magen*).

Allerdings war MGMT bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nur sporadisch methyliert. So fand sich bei diesem Gen lediglich in jeweils 7,1 Prozent der Tumoren (3/42) und Bronchialepithelien (2/28) sowie in 2,4 Prozent der Lungengewebsproben (1/42) eine Methylierung. Dabei war bei demjenigen Patienten mit Methylierung im Lungengewebe auch der Tumor für diese Veränderung positiv. In den beiden Fällen mit Bronchusmethylierung lag jedoch keine Korrelation zum Tumorgewebe vor.

Die hier beobachteten Methylierungsraten stehen daher sowohl mit der Erkenntnis, dass diese epigenetische Veränderung als eine Hauptursache für die Inaktivierung von MGMT angesehen wird, als auch mit den Ergebnissen einer Reihe bisheriger Untersuchungen, in denen mit Werten zwischen zumeist 10 und 55 Prozent deutlich höhere Methylierungsraten im Lungentumorgewebe vorlagen, im Widerspruch. In der Arbeit von Brabender et al., 2003 war MGMT zusätzlich in 17,8 Prozent und in der Veröffentlichung von Licchesi et al., 2008 in 21,3 Prozent der untersuchten Fälle im Normalgewebe methyliert, wobei nicht zwischen Lungen- und Bronchusgewebe unterschieden wurde. In anderen Untersuchungen war Normalgewebe nur selten beziehungsweise gar nicht betroffen (Esteller et al., 1999a; Zöchbauer-Müller et al., 2001; Yanagawa et al., 2007). Eine Übersicht zu den Ergebnissen anderer Studien findet sich in Tabelle 6.1.

Untersuchungen an Risikopatienten zeigten außerdem, dass MGMT bereits Monate bis wenige Jahre vor der Diagnose des Malignoms im Sputum methyliert sein (Palmisano et al., 2000; Belinsky et al., 2006) und diese epigenetische Veränderung mit fortschreitender maligner Transformation zunehmen kann (Belinsky et al., 2006). Letzterer Aspekt findet Bestätigung in den Ergebnissen von Licchesi et al., 2008, die eine Häufung der Methylierung von Normalgewebe über Vorläuferläsionen bis hin zum Adenokarzinom beobachteten. Einer weiteren Studie zufolge fand sich im Sputum von jeweils 65 Prozent der untersuchten COPD- und Lungenkarzinompatienten eine Methylierung von MGMT (Guzmán et al., 2012). Auch in der Bronchiallavage ließ sich bei positivem Primärtumor zu 58 Prozent diese epigenetische Veränderung detektieren (Topaloglu et al., 2004). Anderen Arbeitsgruppen gelang der Methylierungsnachweis dieses Gens im Serum von Lungenkarzinompatienten und zwar in einer Häufigkeit, die mit 17 (13/76) (Begum et al., 2011), 18 (6/33) (Russo et al., 2005), 18,7 (17/91) (Fujiwara et al., 2005) und sogar 66 Prozent (4/6) (Esteller et al., 1999a) – hier allerdings bei sehr geringer Probenzahl – der Fälle ebenfalls die Ergebnisse dieser Arbeit quantitativ übertrifft.

Studie	NSCLC (%)	Normalgewebe (%)
Ali et al., 2011 <sup>1)</sup>	20 (-/-)	-
Begum et al., 2011 <sup>2)</sup>	30 (3/10)	-
Brabender et al., 2003 <sup>2)</sup>	37,8 (34/90)	17,8 (16/90)
Esteller et al., 1999a <sup>2)</sup>	27 (6/22)	0 (0/22)
Esteller et al., 1999b <sup>2)</sup>	29 (10/34)	0 (-/-)
Feng et al., 2008 <sup>2)4)</sup>	8 (4/49)	2 (1/49)
5)	4 (2/49)	0 (0/49)
Gu et al., 2006 <sup>2)</sup>	17,4 (27/155)	-
Guo et al., 2004 <sup>2)</sup>	70 (14/20)	7,1 (1/14)
de Jong et al., 2009 <sup>2)3)</sup>	1 (1/10)	0 (0/10)
Licchesi et al., 2008 <sup>2)</sup>	77,8 (14/18)	21,3 (10/47)
Lin et al., 2009 <sup>1)</sup>	1,49 (1/67)	-
Liu et al., 2006 <sup>2)</sup>	30,3 (37/122)	-
Maruyama et al., 2004 <sup>1)</sup>	0,8 (1/124)	-
Pulling et al., 2003 <sup>2)</sup>	51 (121/237)	-
Russo et al., 2005 <sup>2)</sup>	55 (18/33)	-
Scesnaite et al., 2012 <sup>2)</sup>	15,1 (32/212)	-
Safar et al., 2005 <sup>2)</sup>	10 (10/105)	3 (1/32)
Topaloglu et al., 2004 <sup>2)</sup>	39 (12/31)	-
Toyooka et al., 2003 <sup>1)</sup>	1 (-/-)	-
2)	15 (-/-)	-
Wu et al., 2008 <sup>1)</sup>	49,5 (109/220)	-
Yanagawa et al., 2007 <sup>1)</sup>	14 (14/101)	2 (2/101)
Zöchbauer-Müller et al., 2001 <sup>2)</sup>	21 (22/107)	0 (0/104)

- 1) Patienten aus asiatischem Raum
- 2) Patienten aus USA, Australien oder Europa
- 3) Untersuchungsmaterial bronchoskopisch durch Bürstenzytologie gewonnen
- 4) Cut-off < 4 Prozent
- 5) Cut-off  $\geq$  4 Prozent

**Tabelle 6.1 Methylierungsergebnisse für MGMT in NSCLC-Primärtumoren und dazugehörigem Normalgewebe in verschiedenen Studien**

In einer neueren Untersuchung ergab sich jedoch keine Assoziation zwischen der Methylierung von MGMT im Tumor und den dazugehörigen Blutproben (Kontic et al., 2012), in einer anderen Veröffentlichung kein Zusammenhang zwischen der Methylierung dieses Gens im Serum und klinisch-pathologischen Parametern inklusive dem Überleben der Pa-

tienten (Hoffmann et al., 2009), so dass das Screening von Serum auf diese Veränderung hin im Rahmen einer Krebsfrüherkennung wohl doch nicht geeignet erscheint (Kontic et al., 2012). Auch die Methylierungsanalyse von Zellen aus Pleuraflüssigkeit stellt offensichtlich keine adäquate Untersuchungsmethode zur frühzeitigen Erkennung von Pleura-metastasen dar (Kaczmarczyk et al., 2012).

Nur wenige Untersuchungen an Primärtumoren ergeben niedrige Methylierungsraten von ein bis zwei Prozent (Toyooka et al., 2003; Maruyama et al., 2004; Lin et al., 2009; de Jong et al., 2009). Allerdings wurden diese mit Ausnahme von de Jong et al., 2009 in asiatischen Patientenkollektiven beschrieben, während die meisten der in Tabelle 6.1 genannten Studien mit hohen Methylierungsraten an Patienten aus Europa, den USA oder Australien durchgeführt wurden (Esteller et al., 1999a und 1999b; Zöchbauer-Müller et al., 2001; Brabender et al., 2003; Pulling et al., 2003; Toyooka et al., 2003; Guo et al., 2004; Topaloglu et al., 2004; Safar et al., 2005; Russo et al., 2005; Gu et al., 2006; Liu et al., 2006; Licchesi et al., 2008; Begum et al., 2011; Scesnaite et al., 2012). Besonders eindrücklich scheint dieser Effekt in der Arbeit von Toyooka et al., 2003, die bei Patienten aus den USA und Australien eine Methylierungshäufigkeit von 15 Prozent, bei Japanern und Taiwanen jedoch nur von einem Prozent beobachteten. Doch auch drei Arbeiten, die asiatische Patienten untersuchten, konnten eine Methylierung in 14 (Yanagawa et al., 2007) beziehungsweise 20 (Ali et al., 2011) und sogar in 49,5 Prozent (Wu et al., 2008) der Fälle nachweisen, was der Vermutung widerspricht, dass ethnische Unterschiede Einfluss auf die Methylierung von MGMT nehmen. Was europäische und US-amerikanische Untersuchungen anbelangt, gibt es unter den zitierten Studien zwei Ausnahmen: Die eine stellt eine Untersuchung an niederländischen Patienten dar, die eine Methylierungsrate von einem Prozent beschreibt. Allerdings war die Stichprobe mit 10 Probanden sehr klein und zudem wurde das Gewebe bronchoskopisch mittels Bürstenzytologie und nicht durch Resektion oder Biopsie gewonnen (de Jong et al., 2009). Bei der zweiten handelt es sich um die Analysen von Feng et al., 2008, der bei US-amerikanischen Patienten bei einem Cut-off-Wert kleiner vier Prozent eine Methylierungsrate von acht Prozent, ab diesem Grenzwert jedoch nur noch von vier Prozent beobachtete. Der Aspekt der Ethnizität lässt sich jedoch auch dadurch nur eingeschränkt beurteilen, da gerade Patientenkollektive aus den USA durchaus aus unterschiedlichen Ethnien bestehen können: Dies wird teilweise in den Studien nicht deklariert (vgl. Topaloglu et al., 2004; Russo et al., 2005; Licchesi et al., 2008), während andere Untersuchungen zwar zwischen „Weißen“ und anderen Ethnien unterscheiden, aber beispielsweise Native Americans, Hispanics und Afroamerikaner zu einer

Gruppe zusammenfassen (vgl. Pulling et al., 2003). Feng et al., 2008 listen zwar die Verteilung der Bevölkerungsgruppen exakt auf, interpretieren ihre Ergebnisse jedoch nicht nach Ethnien aufgeschlüsselt. Folglich dürfen ethnische Unterschiede, wie von Liu et al., 2006 und Lin et al., 2009 diskutiert, nur sehr begrenzt als Argument für divergente Methylierungsergebnisse angeführt werden. Die Daten von Leng et al., 2011 sprechen wiederum für einen gewissen Einfluss der Ethnizität auf die Methylierungshäufigkeit, vermuten sie doch die Existenz einer Allel-spezifischen Methylierung (ASM): Ihren Untersuchungen zufolge scheint MGMT beim Adenokarzinom in Abhängigkeit einer bestimmten Ausprägung eines Single Nucleotide Polymorphism (SNP) im Bereich einer Promoter-Enhancer-Region dieses Gens häufiger methyliert zu sein.

Lin et al., 2009 diskutieren zusätzlich weitere Gründe für die niedrigen Methylierungsraten in ihrem Patientengut: Neben Erwägungen zum Einfluss der Ethnizität auf die Methylierung von MGMT geben sie auch zu bedenken, dass in ihrer Arbeit nur Patienten im Stadium I eingeschlossen waren und die Methylierung von MGMT gerade erst in höheren Stadien relevant werden könnte. Licchesi et al., 2008 vermuten wiederum, dass diese epigenetische Veränderung ein eher frühes Ereignis darstellt, da MGMT bereits in normaler Lunge sowie in Krebsvorstufen wie der atypischen adenomatösen Hyperplasie methyliert war. De Jong et al., 2009 untersuchten, wenn auch in kleiner Fallzahl, fast ausschließlich Gewebe von Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien, fanden aber kaum eine Methylierung, was letztgenannte These zu stützen scheint. In der hier vorliegenden Arbeit befand sich die Mehrheit der eingeschlossenen Patienten in den Stadien I und II (69%), ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Methylierung und Stadiengruppierung ließ sich jedoch weder in Bronchus-, noch in Lungen- oder Tumorgewebe herstellen. Auch andere Studien konnten diesen mit Ausnahme von Pulling et al., 2003 in ihren Untersuchungen am Tumorgewebe nicht aufzeigen (Zöchbauer-Müller et al., 2001; Brabender et al., 2003; Toyooka et al., 2003; Liu et al., 2006; Yanagawa et al., 2007; Ali et al., 2011; Scesnaite et al., 2012). Andere Arbeiten machen beispielsweise wiederum gar keine Aussage über die Stadienverteilung in ihrem Patientenkollektiv (Toyooka et al., 2003; Wu et al., 2008) oder korrelieren diese nicht mit dem Methylierungsstatus (Feng et al., 2008), was zusätzlich die Vergleichbarkeit der Untersuchungen untereinander erschwert. Insgesamt scheint die von Lin et al., 2009 angeführte Überlegung, diese epigenetische Veränderung trete in Abhängigkeit vom Tumorstadium auf, weniger relevant zu sein.

Was andere klinisch-pathologische Parameter wie Überleben, Tumorgrading, Histologie, Alter der Patienten zum Diagnosezeitpunkt und Geschlecht betrifft, ließ sich in der vorlie-

genden Arbeit keinerlei signifikante Korrelation zum Methylierungsstatus von MGMT herstellen, womit sich eine weitgehende Übereinstimmung mit anderen zitierten Studienergebnissen ergibt (Zöchbauer-Müller et al., 2001; Pulling et al., 2003; Safar et al., 2005; Gu et al., 2006: *Überleben*; Brabender et al., 2003: *Grading*; Zöchbauer-Müller et al., 2001; Brabender et al., 2003; Pulling et al., 2003; Liu et al., 2006; Yanagawa et al., 2007; Ali et al., 2011; Scesnaite et al., 2012: *Histologie*; Zöchbauer-Müller et al., 2001; Brabender et al., 2003; Pulling et al., 2003; Toyooka et al., 2003; Gu et al., 2006; Liu et al., 2006; Yanagawa et al., 2007; Scesnaite et al., 2012: *Geschlecht*; Zöchbauer-Müller et al., 2001; Gu et al., 2006; Liu et al., 2006; Yanagawa et al., 2007; Ali et al., 2011: *Alter*). Lediglich bei Brabender et al., 2003 wiesen Patienten mit Methylierung deutlich kürzere Überlebenszeiten auf.

In Bezug auf den Raucherstatus der Patienten ist die Studienlage deutlich heterogener. Allerdings waren in der hier vorliegenden Arbeit im Patientenkollektiv lediglich fünf Nichtraucher eingeschlossen, weshalb bereits aufgrund der kleinen Stichprobengröße keine verlässliche Aussage bezüglich der Methylierung in Abhängigkeit vom Nikotinkonsum zu treffen ist. Wie auch in dieser Studie konnten Zöchbauer-Müller et al., 2001, Brabender et al., 2003 und Yanagawa et al., 2007 keine signifikante Korrelation zwischen dem Rauchverhalten und dem Methylierungsstatus herstellen, wohingegen eine andere Untersuchung diese epigenetische Veränderung bei Rauchern häufiger und unter diesen wiederum öfter bei Männern als bei Frauen beobachtete (Liu et al., 2006). Pulling et al., 2003 wiesen jedoch in ihrem Patientengut signifikant höhere Methylierungsraten bei Nichtrauchern nach. Wu et al., 2008 konnten die höchste Methylierung im Adenokarzinom männlicher Nichtraucher beobachten, gefolgt von Männern mit und schließlich Frauen ohne Nikotinkonsum. Beim Plattenepithelkarzinom zeigte sich kein Unterschied zwischen rauchenden und nicht-rauchenden Männern, während männliche Nichtraucher diese epigenetische Veränderung häufiger als weibliche aufwiesen. Liu et al., 2006 geben zudem zu bedenken, dass die Definition, welcher Patient als Raucher und welcher als Nichtraucher gilt, nicht unbedingt einheitlich ist, was die Vergleichbarkeit der Studienergebnisse einschränkt. Außerdem muss bedacht werden, dass gerade der Nikotinkonsum einen anamnestisch schwer zu erhebenden Parameter darstellt.

Weitere Gründe für die Divergenz der einzelnen Studienergebnisse im Hinblick auf die Methylierungshäufigkeiten könnten in den verwendeten Analysemethoden liegen. Safar et al., 2005 und Guzmán et al., 2012 erwägen, dass die Art der Gewebekonservierung Einfluss auf die gefundene Methylierung haben könnte: Während einige Untersuchungen wie

auch diese an paraffineingebettetem Material durchgeführt wurden (Esteller et al., 1999b; Pulling et al., 2003; Guo et al., 2004; Safar et al., 2005; Feng et al., 2008; Licchesi et al., 2008; Ali et al., 2011; Scesnaite et al., 2012), isolierte man in anderen die DNA aus tiefgefrorenem Gewebe (Brabender et al., 2003; Toyooka et al., 2003; Guo et al., 2004; Maruyama et al., 2004; Topaloglu et al., 2004; Russo et al., 2005; Gu et al., 2006; Liu et al., 2006; Yanagawa et al., 2007; Wu et al., 2008; Lin et al., 2009; Begum et al., 2011). Somit ist nicht auszuschließen, dass durch die genannten Konservierungsprozesse beziehungsweise auch im Rahmen der Entparaffinierung Veränderungen an der DNA und unter Umständen auch an Methylgruppen hervorgerufen werden. Insbesondere waren die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Gewebeproben schon Jahre vor der Methylierungsanalyse gewonnen worden, so dass eine Schädigung der Nukleinsäuren auch durch lange Lagerzeiten in Betracht kommen könnte.

Zudem verwendeten alle zitierten Studien Methoden zum Nachweis von Methylierungen, die eine Konversion der DNA durch Bisulfit voraussetzen. Hierbei werden nicht-methylierte Cytosine durch Desaminierung in Uracil umgewandelt, wohingegen methylierte Cytosine als solche erhalten bleiben (Frommer et al., 1992). Durch diesen Vorgang verändert sich die Basensequenz nicht-methylierter DNA. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass die Konversion unmethylierter Cytosine nicht vollständig erfolgt (Rand et al., 2002; Warnecke et al., 2002; Kristensen et al., 2008) und somit das Vorliegen von Methylierungen angenommen wird, auch wenn dies nicht zutrifft. Folglich ist tatsächlich nicht auszuschließen, dass aufgrund unvollständiger Bisulfitkonversion die Methylierungsraten in diesen Arbeiten überschätzt wurden. Daher wird bisweilen vorgeschlagen, in solche Analysen einen Kontrollschritt für die inkomplette Umwandlung von Cytosin zu Uracil einzubauen (Rand et al., 2002; Kristensen et al., 2008). Darüber hinaus stellt bisulfitmodifizierte DNA ein instabiles und schlecht lagerungsfähiges Produkt dar (Bettstetter et al., 2008).

Außerdem kann die Verwendung von methylierungsspezifischen Primern, die nicht ausreichend zwischen bisulfitkonvertierter und nicht-konvertierter DNA unterscheiden, zu falsch positiven Methylierungsergebnissen führen (Kristensen et al., 2008). Brandes et al., 2007 wiesen dieses Problem für das Gen ATM nach. Den Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe nach dürfte diese Fehlerquelle bei MGMT jedoch nicht allzu sehr zum Tragen kommen, da bei Durchführung der Analyse mit Primern, die mit unterschiedlichen Programmen designed wurden, ähnliche Methylierungsergebnisse erzielt wurden (Brandes et al., 2007). Nichtsdestotrotz ist nicht gänzlich auszuschließen, dass in einigen der oben zitierten

Studien Primer mit ungenügender Spezifität für bisulfitkonvertierte DNA verwendet wurden.

Zusätzlich wurde in vielen Studien die Methylierung von MGMT nur qualitativ und nicht quantitativ nachgewiesen (Esteller et al., 1999a und 1999b; Palmisano et al., 2000; Zöchbauer-Müller et al., 2001; Pulling et al., 2003; Toyooka et al., 2003; Guo et al., 2004; Maruyama et al., 2004; Fujiwara et al., 2005; Russo et al., 2005; Safar et al., 2005; Belinsky et al., 2006; Liu et al., 2006; Yanagawa et al., 2007; Licchesi et al., 2008; Wu et al., 2008; Lin et al., 2009; Ali et al., 2011; Guzmán et al., 2012; Scesnaite et al., 2012), so dass keine Aussage über den Grad dieser Veränderung in der einzelnen Probe gemacht werden kann, während in der vorliegenden Arbeit erst eine Probe als methyliert gewertet wurde, wenn mehr als vier Prozent der DNA diese Veränderung aufwies. Daher ist nicht auszuschließen, dass einige Autoren von einer Methylierung ausgehen, obwohl diese keinerlei klinische Relevanz besitzt, zumal mit der methylierungsspezifischen PCR (MSP) der qualitative Nachweis bereits von Methylierungen von 0,1 Prozent möglich sein soll (Herman et al., 1996). Eine Reihe von Untersuchungen verwendete außerdem eine nested-PCR (Palmisano et al., 2000; Pulling et al., 2003; Guo et al., 2004; Belinsky et al., 2006; Liu et al., 2006; Licchesi et al., 2008; Wu et al., 2008; Ali et al., 2011; Guzmán et al., 2012), was zwar die Sensitivität erhöht, dies allerdings auf Kosten der Spezifität und Reproduzierbarkeit (Übersicht in: Grote et al., 2007). Doch auch die Vergleichbarkeit von Studien, die sich quantitativer Methoden bedienten, ist begrenzt: Eine nannte keinen Cut-off-Wert (Brabender et al., 2003), während andere diesen bereits bei null Prozent ansetzten (Topaloglu et al., 2004; Begum et al., 2011). Lediglich Feng et al., 2008 unterschieden in ihrer Auswertung eine Methylierung kleiner vier und größer oder gleich vier Prozent. Auch das Vorgehen zur Festlegung des Cut-off-Wertes war in den verschiedenen Studien unterschiedlich: Beispielsweise wurde dieser im Verhältnis zur Methylierung von Untersuchungsmaterial gesunder Probanden (Topaloglu et al., 2004; de Jong et al., 2009) oder in Relation zu dem Kontrollgen ACTB (Gu et al., 2006; Feng et al., 2008; de Jong et al., 2009; Begum et al., 2011) bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch durch Vergleich eines Quantifizierungs- und Kalibratoransatzes ein und derselben DNA-Probe der relative Anteil der methylierten Moleküle ermittelt (Bettstetter et al., 2008). Schließlich dürften unterschiedliche PCR-Bedingungen ebenso wie der analysierte Bereich innerhalb der Promotorregion Einfluss auf die Nachweisfrequenz dieser epigenetischen Veränderung nehmen (Feng et al., 2008). Meng et al., 2008 zeigten beim Lungenadenokarzinom – wenn auch nicht speziell für MGMT –, dass CpG-Nukleotide ein sehr variables Methylierungsmuster



aufweisen können. Mikeska et al., 2007 geben zu bedenken, dass die Methylierung von CpG-Positionen innerhalb der untersuchten Region nicht automatisch den Methylierungsstatus der gesamten Promotorregion widerspiegelt.

Somit ist die Vergleichbarkeit der Studien nicht nur durch geographisch-ethnische Unterschiede, durch die Heterogenität der Studienkollektive in Bezug auf klinisch-pathologische Parameter und die uneinheitliche Definition dieser, sondern auch durch unterschiedliche Gewinnung und Konservierung des Untersuchungsmaterials sowie die Art und Auswertung der Methylierungsanalysen limitiert. Folglich lassen sich daraus nur schwer Aussagen darüber ableiten, warum einige Studien hohe Methylierungsraten nachweisen konnten, andere wie auch die vorliegende Untersuchung jedoch nicht.

Neueren Erkenntnissen zufolge soll eine Methylierung der Promotorregion von MGMT nicht unbedingt mit einem Gene-Silencing assoziiert sein. So fand sich in einer Adenokarzinom- sowie in einer Plattenepithelkarzinomzelllinie trotz Methylierung die Expression dieses Gens (Pasini et al., 2012). Allerdings untersuchte diese Arbeit lediglich zwei Zelllinien, so dass deren Repräsentativität durchaus begrenzt ist. Trotzdem dürfte diese Studie die bereits früher beim kolorektalen Karzinom geäußerte Vermutung stützen, dass das Vorliegen dieser Modifikation bei MGMT nicht automatisch gleichbedeutend mit einem Expressionsverlust ist (Xu et al., 2004). Ein möglicher Grund für diese Beobachtungen könnte auch das bereits weiter oben genannte Argument (Mikeska et al., 2007) der fehlenden Korrelation zwischen der Methylierung im untersuchten DNA-Bereich und der gesamten Promotorregion sein.

Letztlich erscheint aufgrund der in dieser Arbeit ermittelten niedrigen Methylierungshäufigkeiten in Bronchus-, Lungen- und Tumorgewebe das Screening auf diese epigenetische Modifikation bei MGMT im Rahmen der Früherkennung als eher ungeeignet. Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit bei zwei Patienten Bronchialepithel methyliert war, nicht jedoch das zugehörige Tumorgewebe, spricht außerdem dagegen, dass die Inaktivierung dieses Gens zur Tumorentstehung beitragen könnte und zieht die Ergebnisse oben genannter Studien zum Auftreten dieser Veränderung im Sputum geraume Zeit vor Diagnostikstellung beziehungsweise in Vorläuferstadien in Zweifel. Allerdings ist die Aussagekraft aufgrund der geringen Fallzahl sehr begrenzt und ausschließlich als Hinweis zu verstehen. Bei zudem fehlender Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern lassen sich aus dem Methylierungsstatus keine prognostischen Aussagen machen.

### 6.2.2 Ras-Association-Domain-Family-Protein-1 (RASSF1A)

Ähnlich wie bei MGMT wurden auch bei RASSF1A Methylierungen sowie der methylierungsabhängige Expressionsverlust in einer Vielzahl von Malignomen (Burbee et al., 2001: *Mamma*; Byun et al., 2001: *Magen*; Dreijerink et al., 2001; Yoon et al., 2001; McDonald et al., 2009: *Niere*; Lee et al., 2001: *Blase*; Yoon et al., 2001: *Ovar*; Kuzmin et al., 2002: *Prostata*; Schagdarsurengin et al., 2002: *Schilddrüse*; Dammann et al., 2003: *Pankreas*; Dong et al., 2003: *Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs*; Kuzmin et al., 2003: *Zervix*; Hesson et al., 2004: *Gehirn*; Mao et al., 2011: *Ösophagus*; Xu et al., 2013: *Leber*), darunter auch in vielen Lungenprimärtumoren (Dammann et al., 2000; Dammann et al., 2001: *SCLC*; Dammann et al., 2000; Lin et al., 2009: *NSCLC*) und Lungentumorzelllinien (Dammann et al., 2000; Burbee et al., 2001: *SCLC und NSCLC*; Lin et al., 2009: *NSCLC*), beobachtet. Durch Demethylierung von NSCLC-Zelllinien gelang es, die Expression von RASSF1A wieder herzustellen (Dammann et al., 2000; Burbee et al., 2001). Außerdem konnte durch die experimentell induzierte Reexpression dieses Gens das Wachstum von Tumorzellen inhibiert werden (Dammann et al., 2000; Dreijerink et al., 2001; Kuzmin et al., 2002; Hesson et al., 2004), was eine Funktion dieser Variante als Tumorsuppressorgen nahelegt.

In dieser Arbeit war RASSF1A im Tumor- zu 26,2 Prozent (11/42), im Bronchial- zu 3,4 Prozent (1/29), im Lungengewebe (0/42) hingegen überhaupt nicht methyliert. Dabei war diese epigenetische Veränderung pro Patient ausschließlich in einem Gewebetyp zu finden. In der Literatur werden Methylierungsraten im Tumorgewebe angegeben, die für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom zwischen 15 und 45 Prozent, beim kleinzelligen Bronchialkarzinom mit Werten über 70 Prozent sogar noch höher liegen. Im nicht-malignen Normalgewebe konnten nur vier der nachfolgend zitierten Untersuchungen eine Methylierung von RASSF1A nachweisen, wobei diese mit Ausnahme von Licchesi et al., 2008, die eine Methylierungshäufigkeit von 12,8 Prozent beobachteten, nur sporadisch auftrat (Safar et al., 2005; Kim et al., 2007; Yanagawa et al., 2007; Lee et al., 2012). Eine Übersicht zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen findet sich in Tabelle 6.2.

RASSF1A wurde allerdings nicht nur in bioptisch gewonnenem Untersuchungsmaterial hinsichtlich dieser epigenetischen Veränderung analysiert. Zwei Studien, die Bronchialaspirate untersuchten, konnten bei 30 beziehungsweise 29 Prozent der NSCLC-Patienten und bei 83 respektive 88 Prozent der SCLC-Patienten eine Methylierung von RASSF1A nachweisen, nicht jedoch bei Patienten mit ausschließlich benignen Lungenerkrankungen (Schmiemann et al., 2005; Grote et al., 2006). Topaloglu et al., 2004 gelang bei 29 Prozent der untersuchten Patienten der Methylierungsnachweis in der Bronchiallavage, sofern auch

der Primärtumor methyliert war. Bei van der Drift et al., 2011 fand sich sogar in 42,6 Prozent der Studienteilnehmer diese Veränderung in mittels Lavage und Bürstenzytologie gewonnenem Material. Einige Arbeiten wiesen auch im Sputum von Erkrankten diese Veränderung in 28 bis 30 (Hubers et al., 2012) beziehungsweise 38,5 (Shivapurkar et al., 2007) Prozent nach, in einer anderen gelang dies jedoch nur in 5 Prozent der Tumorpatienten und bei 0,9 Prozent der untersuchten nicht-erkrankten Raucher (Cirincione et al., 2006). Begum et al., 2011 analysierten das Serum von Lungenkarzinompatienten und fanden eine Methylierung in 7,9 Prozent (6/76), Fujiwara et al., 2005 sogar in 12,1 Prozent (11/91) der Fälle. Andere Arbeitsgruppen konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen der Methylierung von RASSF1A im Tumor und der dazugehörigen Blutprobe herstellen (Vaissière et al., 2009; Kontic et al., 2012), weshalb sie den Nutzen einer Früherkennungsuntersuchung aus diesem Untersuchungsmaterial in Frage stellen (Kontic et al., 2012).

Somit decken sich die Ergebnisse der Studien, die direkt Tumorgewebe untersuchen, weitgehend mit denen, die auf andere Materialien wie Bronchialaspirate oder Sputum zurückgreifen. Mit einer Methylierung von 26,2 Prozent im Tumorgewebe liegt diese Arbeit folglich in einer Größenordnung, die von den hier zitierten Studien vorgegeben wird, wenngleich sie eher im unteren Bereich anzusiedeln ist. Die Tatsache, dass RASSF1A lediglich bei einem Patienten im Bronchial-, nie jedoch im Lungengewebe methyliert war, ist ebenfalls mit bisherigen Veröffentlichungen in Einklang zu bringen.

Studie	NSCLC (%)	SCLC (%)	Normalgewebe (%)	
Agathangelou et al., 2001 <sup>1)8)</sup>	34 (14/41)	72 (21/29)	0 (0/-)	
Begum et al., 2011 <sup>2)7)</sup>	50 (5/10)	-	-	
Burbee et al., 2001 <sup>2)6)</sup>	30 (32/107)	-	0 (0/104)	
Choi et al., 2005 <sup>1)6)</sup>	40,5 (47/116)	-	0 (0/60)-	
Cirincione et al., 2006 <sup>2)6)</sup>	51,7 (15/29)	-	-	
Dammann et al., 2000 <sup>2)6)9)</sup>	38 (22/58)	100 (2/2)	0 (1/19)	
Endoh et al., 2003 <sup>1)6)10)</sup>	42 (42/100)	-	-	
Feng et al., 2008 <sup>2)7)</sup>	24 (12/49)	-	0 (0/49)	
Gu et al., 2006 <sup>2)7)</sup>	27,1 (42/155)	-	-	
Guo et al., 2004 <sup>2)6)</sup>	60 (12/20)	-	0 (0/14)	
De Jong et al., 2009 <sup>2)4)7)</sup>	40 (4/10)	-	0 (0/10)	
Kim et al., 2007 <sup>1)6)</sup>	40 (40/99)	-	1 (1/99)	
Kim et al., 2003 <sup>1)6)</sup>	32 (65/204)	-	-	
Kim et al., 2004 <sup>1)6)</sup>	38 (32/85)	-	-	
Kubo et al., 2009 <sup>1)6)</sup>	31 (30/100)	-	0 (0/30)	
Licchese et al., 2008 <sup>2)6)</sup>	58,8 (10/17)	-	12,8 (6/47)	
Maruyama et al., 2004 <sup>1)6)</sup>	41 (51/124)	-	-	
Lee et al., 2012 <sup>1)5)</sup>	44,7 (92/206)	-	2,5 (1/40)	
<sup>6)</sup>	37,4 (77/206)	-	-	
Lin et al., 2009 <sup>1)6)11)</sup>	42,7 (53/124)	-	-	
Niklinska et al., 2009 <sup>2)6)</sup>	26 (18/70)	-	-	
Safar et al., 2005 <sup>2)6)</sup>	15 (16/105)	-	6 (2/32)	
Scesnaite et al., 2012 <sup>2)6)</sup>	28,9 (61/212)	-	-	
Seng et al., 2008 <sup>2)7)</sup>	32,6 (78/239)	-	-	
Shivapurkar et al., 2007 <sup>2)7)</sup>	45 (18/40)	-	-	
Tomizawa et al., 2004 <sup>1)6)</sup>	29 (35/120)	-	-	
Topaloglu et al., 2004 <sup>2)7)</sup>	45 (14/31)	-	-	
Vaissière et al., 2009 <sup>3)5)</sup>	36 (75/209)	-	-	
Yanagawa et al., 2007 <sup>1)6)</sup>	42 (42/101)	-	3 (3/101)	
1)	Patienten aus asiatischem Raum		7)	MSP, quantitativ
2)	Patienten aus USA, Australien oder Europa		8)	Sequenzierung/Verwendung von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen
3)	Patienten aus Russland		9)	Bisulfitsequencing
4)	Untersuchungsmaterial bronchoskopisch durch Bürstenzytologie gewonnen		10)	MSP, qualitativ; Restriktionsenzyme
5)	Pyrosequencing, quantitativ		11)	lediglich Patienten im Stadium I untersucht
6)	MSP, qualitativ			

**Tabelle 6.2 Methylierungsergebnisse für RASSF1A im Primärtumor und dazugehörigem Normalgewebe in verschiedenen Studien**

In Bezug auf klinisch-pathologische Parameter wie dem Alter zum Diagnosezeitpunkt, Geschlecht, TNM-Stadium und Stadiengruppierung, Grading, Residualtumor und Histologie konnte in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Zusammenhang hergestellt werden, womit sich großenteils eine Übereinstimmung mit der bisherigen Studienlage ergibt (Burbee et al., 2001; Endoh et al., 2003; Kim et al., 2003; Tomizawa et al., 2004; Gu et al., 2006; Kim et al., 2007; Yanagawa et al., 2007; Seng et al., 2008; Vaissière et al., 2009; Scesnaite et al., 2012: *Alter*; Burbee et al., 2001; Endoh et al., 2003; Kim et al., 2003; Tomizawa et al., 2004; Gu et al., 2006; Kim et al., 2007; Yanagawa et al., 2007; Seng et al., 2008; Scesnaite et al., 2012: *Geschlecht*; Burbee et al., 2001; Agathangelou et al., 2001; Endoh et al., 2003; Kim et al., 2003; Tomizawa et al., 2004; Choi et al., 2005; Kim et al., 2007; Yanagawa et al., 2007; Seng et al., 2008; Scesnaite et al., 2012: *TNM-Stadium/Stadiengruppierung*; Tomizawa et al., 2004: *Grading*; Agathangelou et al., 2001; Burbee et al., 2001; Endoh et al., 2003; Cirincione et al., 2006; Yanagawa et al., 2007; Vaissière et al., 2009; Scesnaite et al., 2012: *Histologie*). Nur wenige Arbeiten beobachteten eine Zunahme der Methylierung von RASSF1A mit dem Tumorstadium (Shivapurkar et al., 2007; Niklinska et al., 2009), der fortschreitenden Entdifferenzierung (Choi et al., 2005) und der Invasivität der Malignomzellen (Kubo et al., 2009). Öfters wird hingegen ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Methylierung von RASSF1A und der Histologie des Lungentumors beschrieben, wobei Adenokarzinome in der Regel häufiger als Plattenepithelkarzinome methyliert waren (Kim et al., 2003; Tomizawa et al., 2004; Gu et al., 2006; Kim et al., 2007; Niklinska et al., 2009). Lediglich bei Seng et al., 2008 war das großzellige Karzinom im Vergleich zu vorgenannten Entitäten stärker betroffen. Zwei Studien beobachteten diese epigenetische Veränderung häufiger bei Männern als bei Frauen (Kubo et al., 2009; Vaissière et al., 2009).

Auch zwischen dem Überleben und der Methylierung von RASSF1A fand sich in dieser Untersuchung wie auch in drei zitierten Arbeiten kein signifikanter Zusammenhang (Endoh et al., 2003; Maruyama et al., 2004; Niklinska et al., 2009). Andere Studien konnten jedoch durchaus eine signifikante Korrelation dieser beiden Parameter herstellen: Während zwei Arbeitsgruppen dies sowohl bei univariater als auch multivariater Analyse beobachteten (Kim et al., 2003; Yanagawa et al., 2007), war dies bei Burbee et al., 2001 nur der Fall, solange potentielle Einflussfaktoren unberücksichtigt blieben. Auch Choi et al., 2005 und Seng et al., 2008 gehen davon aus, dass die Methylierung von RASSF1A keinen unabhängigen Faktor für das Überleben der Patienten darstellt. Somit scheinen sich aus der Methy-

lierung von RASSF1A keine Erkenntnisse über die Prognose der Patienten ableiten zu lassen.

Ein Zusammenhang zwischen dieser epigenetischen Veränderung und dem Nikotinkonsum scheint nicht gegeben zu sein. Weder in dieser Arbeit – die jedoch bei der nur geringen Anzahl von fünf Nichtrauchern in ihrer Aussagekraft sehr beschränkt ist – noch in der Literatur lassen sich dafür gewichtige Hinweise finden (Endoh et al., 2003; Kim et al., 2003; Tomizawa et al., 2004; Choi et al., 2005; Kim et al., 2007; Yanagawa et al., 2007; Vaissière et al., 2009; Scesnaite et al., 2012). Lediglich Kim et al., 2003 beobachteten, dass RASSF1A bei Rauchern, die ihren Konsum vor dem 19. Lebensjahr begannen, signifikant häufiger methyliert war. Ein genereller Zusammenhang zwischen dem Nikotinabusus und der Anzahl der Packyears konnte aber in dieser Untersuchung ebenfalls nicht hergestellt werden. Eine Ausnahme stellen die Ergebnisse von Kubo et al., 2009 dar, die bei Rauchern diese Veränderung deutlich häufiger beobachteten. Allerdings wurden ausschließlich Adenokarzinome mit bronchioalveolärer Komponente untersucht.

Die beschriebenen Unterschiede in der Häufigkeit dieser epigenetischen Veränderung zwischen den einzelnen Untersuchungen – nicht zuletzt auch in Bezug auf die Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern – lassen sich sicherlich auch bei RASSF1A mitunter auf methodische Aspekte (Materialgewinnung, Konservierung, Bisulfitkonversion, Art der Methylierungsanalyse und Interpretation der Ergebnisse, Zusammensetzung des Patientenkollektivs sowie die Erhebung und Bewertung klinisch-pathologischer Daten) zurückführen, wie bereits ausführlich im Abschnitt über das Gen MGMT erläutert wurde. Besonders deutlich werden solche Einflussfaktoren anhand der Arbeit von Lee et al., 2012, die einerseits Methylierungsanalysen von RASSF1A qualitativ mittels methylierungsspezifischer PCR, andererseits quantitativ durch Pyrosequencing durchführten und durchaus divergente Ergebnisse erzielten. Somit ist die Vergleichbarkeit der einzelnen Arbeiten begrenzt. Dammann et al., 2000 geben zudem zu bedenken, dass Tumorgewebe grundsätzlich auch mit Nicht-Tumorzellen kontaminiert sein dürfte. Zwar findet sich im Normalgewebe kaum eine Methylierung von RASSF1A, weshalb dieser Aspekt wohl zu vernachlässigen ist. Trotzdem lassen die Erkenntnisse einer chinesischen Forschergruppe, wonach DNA aus Blutlymphozyten von Lungenkarzinompatienten zu 86 Prozent positiv für diese Veränderung war, im gesunden Vergleichskollektiv jedoch bei niemandem (Li, W. et al., 2012), diese Bedenken nicht gänzlich von der Hand weisen. Die Glaubwürdigkeit und Repräsentativität dieser Arbeit bleibt jedoch anzuzweifeln, wiesen Begum et al., 2011 doch in ihren Serumproben, die durchaus mit Lymphozyten-DNA kontaminiert gewesen sein müssten,

nur in 7,9 Prozent der Fälle eine Methylierung nach. Auch in dieser Arbeit wurde aus gepooltem Vollblut gesunder Probanden gewonnene DNA als Negativkontrolle mituntersucht und diese epigenetische Veränderung nicht detektiert, was oben genanntes Argument der Kontamination von Tumorgewebe mit Nicht-Tumorzellen weiter entkräftet. Kontic et al., 2012 fanden keinen Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus im Tumor und der dazugehörigen Blutprobe. Die bei MGMT diskutierten ethnischen Einflüsse scheinen bei RASSF1A jedoch keine Rolle zu spielen.

Sowohl den Ergebnissen dieser Arbeit als auch der bisherigen Studienlage zufolge stellt die Methylierung von RASSF1A auch beim Bronchialkarzinom ein nicht zu vernachlässigendes Ereignis dar, das mitunter in frühen Krankheitsstadien nachgewiesen werden kann und somit, wie Licchesi et al., 2008 und Lin et al., 2009 argumentieren, bereits zu Beginn der Tumorentstehung eine Rolle spielen dürfte. Den Erkenntnissen dieser Arbeit nach eignet sich die Methylierung von RASSF1A allein allerdings nicht zur Abschätzung der Prognose der Patienten, so wie dies Kim et al., 2003 und Yanagawa et al., 2007 vorschlagen, denn in der vorliegenden Dissertation ließ sich keine Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern herstellen. Auch andere Autoren bezweifeln den Nutzen über die Kenntnis dieser epigenetischen Veränderung von RASSF1A als prognostischem Marker (Choi et al., 2005). Der fehlende Zusammenhang dieser epigenetischen Veränderung mit dem Nikotinkonsum sowie die Tatsache, dass kaum nicht-malignes Normalgewebe von Methylierungen betroffen war, lässt dieses Gen für die Entwicklung von Screeninguntersuchungen bei Risikopersonen, insbesondere bei Rauchern, ebenfalls nicht geeignet erscheinen. Nichtsdestotrotz ist denkbar, dass RASSF1A als Bestandteil eines Panels von Markergenen durchaus einen Stellenwert im Rahmen der Tumordiagnostik erlangen könnte, wofür weitere größer angelegte Studien nötig sein werden. Beispielsweise halten van der Drift et al., 2011 die kombinierte Analyse von RASSF1A-Methylierungen und KRAS-Mutationen in der Bronchiallavage im Rahmen der Lungenkarzinomdiagnostik für geeignet. Außerdem gibt es bereits Hinweise, dass Lungenkarzinompatienten, die eine Methylierung von RASSF1A aufweisen, von einer Carboplatin-Paclitaxel-haltigen Chemotherapie eher profitierten als von einem Cisplatin-Gemcitabin-haltigen Therapieregime (Fraipont et al., 2012).

### **6.2.3 Ras-Protein-Activator-Like-Protein-1 (RASAL1)**

In einer Reihe von Malignomen wurde eine reduzierte Expression von RASAL1 beobachtet, worunter Gehirn-, Haut- und Blasentumoren, Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs (Jin et

al., 2007), das kolorektale (Ohta et al., 2009) und hepatozelluläre Karzinom (Jin et al., 2007; Calvisi et al., 2011) sowie das Mamma- (Jin et al., 2007), Magen- (Seto et al., 2011; Chen et al., 2012; Qiao et al., 2012) und Schilddrüsenkarzinom (Liu, D. et al., 2013) fallen. Der Expressionsverlust dieses Gens scheint dabei mit der Tumorentstehung und -progression assoziiert zu sein (Ohta et al., 2009; Chen et al., 2012). Außerdem zeigten kolorektale Tumorzellen mit RASAL1-Knockout ein gesteigertes Zellwachstum sowie eine veränderte Zellmorphologie (Ohta et al., 2009). Zellen, in denen RASAL1 überexprimiert vorlag, wiesen hingegen eine Wachstumsinhibition auf (Ohta et al., 2009; Seto et al., 2011). Beim Magenkarzinom hemmte die gesteigerte Expression dieses Gens die Zellproliferation, -transformation und -migration (Qiao et al., 2012). Bisweilen konnte ein Zusammenhang zwischen dem Verlust des Genprodukts und der Methylierung der Promotorregion von RASAL1 hergestellt werden (Jin et al., 2007; Ohta et al., 2009; Seto et al., 2011; Calvisi et al., 2011; Liu, D. et al., 2013). Durch Demethylierungsversuche gelang es, die Reexpression dieses Gens zu induzieren (Jin et al., 2007; Qiao et al., 2012; Liu, D. et al., 2013), was ebenfalls das Zellwachstum hemmte (Jin et al., 2007). Überdies scheint die Promotormethylierung von RASAL1 auch eine Rolle bei der Pathogenese der Nieren- (Bechtel et al., 2010) und Leberfibrose (Tao et al., 2011) zu spielen.

RASAL1 war in dieser Arbeit im Bronchus überhaupt nicht, in der Lunge zu 2,4 Prozent und im Tumor zu 4,8 Prozent methyliert. Dies entspricht einem beziehungsweise zwei von 42 untersuchten Patienten, wobei der Patient mit Methylierung im Lungengewebe diese auch im Tumor aufwies. Ein Zusammenhang mit sämtlichen klinisch-pathologischen Parametern konnte nicht hergestellt werden.

Lediglich zwei weitere Arbeiten scheinen sich mit RASAL1 beim Lungenkarzinom beschäftigt zu haben. Während Jin et al., 2007 vier Lungenkarzinomzelllinien, von denen zwei eine Methylierung aufwiesen, untersuchten, konnten Calvisi et al., 2011 auch in 16,7 Prozent (5/30) der untersuchten Lungentumoren eine Methylierung von RASAL1 beobachten (Supplementary Material). Allerdings wird in dieser Studie keine Angabe zur Zusammensetzung des Patientenkollektivs, insbesondere nicht zur Histologie des untersuchten Tumorgewebes gemacht. Dieser Aspekt gewinnt dadurch an Bedeutung, dass Liu, D. et al., 2013 diese Veränderung in erster Linie beim anaplastischen und follikulären, jedoch deutlich weniger beim papillären Schilddrüsenkarzinom und im gesunden Gewebe überhaupt nicht nachwiesen, weshalb auch bei RASAL1 eine gewebs- und tumorspezifische Methylierung diskutiert werden muss. Außerdem scheint RASAL1 nicht ubiquitär beziehungsweise gewebsabhängig auf unterschiedlichem Niveau exprimiert zu sein, wobei endo-



krine Organe wohl die stärkste Expression aufweisen (Allen et al., 1998; Ohta et al., 2009). Folglich stellt sich die Frage, ob RASAL1 beim Lungenkarzinom überhaupt eine Bedeutung als Tumorsuppressor zukommt, und falls doch, vielleicht nur in bestimmten histologischen Subtypen wie dem kleinzelligen Bronchialkarzinom. Hierzu müsste das Expressionsverhalten von RASAL1 auch in den verschiedenen Malignomen der Lunge untersucht werden.

Was die Methylierung in Zelllinien anbelangt, so ist zudem zu bedenken, dass es sich um immortalisierte Zellen handelt, die sich in ihren Eigenschaften und somit auch in ihrem genetischen und epigenetischen Profil von Primärtumoren unterscheiden können und daher eine Übertragbarkeit der Erkenntnisse nicht ohne Weiteres möglich ist. Schließlich wurde bereits in einer früheren Untersuchung zu einem anderen Gen in Zelllinien im Vergleich zu Normalgewebe eine verstärkte Methylierung beobachtet (Jones et al., 1990: *Maus*). Auch Unterschiede in der Methodik der Methylierungsanalyse – wie bereits ausführlich bei den zuvor beschriebenen Genen diskutiert und auch für die nachfolgenden Gene PDCD4, MTSS1 und TUSC3 gültig – müssen bei der Analyse der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Doch auch andere Mechanismen könnten zur Inaktivierung von RASAL1 führen (Calvisi et al., 2011). Vor allem Histonacetylierungen werden dabei in der Literatur immer wieder diskutiert (Ohta et al., 2009; Ma et al., 2010; Seto et al., 2011; Qiao et al., 2012). Zumindest gelang es, in Magen- (Seto et al., 2011; Qiao et al., 2012) und Leberkarzinomzelllinien (Ma et al., 2010) die Expression von RASAL1 durch Deacetylierungsversuche wieder herzustellen. Auch Loss of Heterozygosity wird als Ursache für den Funktionsverlust dieses Gens genannt (Seto et al., 2011). Ohta et al., 2009 konnten dies jedoch beim kolorektalen Karzinom ebenso wenig wie eine homozygote Deletion nachweisen. Die von Kolfshoten et al., 2005 vorgeschlagene Regulation von RASAL1 über den Transkriptionsfaktor PITX1 wurde in zwei Studien nicht bestätigt (Jin et al., 2007; Qiao et al., 2012).

Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge scheint die Methylierung von RASAL1 – wenn überhaupt – eine stark untergeordnete Rolle bei der Pathogenese des Lungenkarzinoms zu spielen. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass andere Abschnitte als der in dieser Arbeit untersuchte innerhalb der Promotorregion stärker von Methylierungen betroffen sein können.

#### 6.2.4 Programmed-Cell-Death-4 (PDCD4)

Wie bereits eingangs erläutert scheint PDCD4 sowohl auf transkriptioneller als auch translationaler Ebene über verschiedene Wege in diverse Zellfunktionen einzugreifen und somit als Tumorsuppressorgen zu fungieren. Folglich könnte sein Verlust oder die verminderte Expression bei verschiedenen Tumorentitäten eine Rolle spielen. Hinweise hierfür liegen beispielsweise für das Kolon- (Göke et al., 2004; Yang et al., 2006; Mudduluru et al., 2007; Asangani et al., 2008; Wang et al., 2008), Magen- (Motoyama et al., 2010; Cao, Z. et al., 2012), Mamma- (Afonja et al., 2004; Göke et al., 2004; Wen et al., 2007), Ösophagus- (Fassan et al., 2010), Ovarial- (Wei et al., 2009), Pankreas- (Ma et al., 2005), Prostata- (Göke et al., 2004; Shiota et al., 2009), Nieren- (Jansen et al., 2004: *Zelllinie*; Li, X. et al., 2012) und hepatozelluläre Karzinom (Zhang et al., 2006; Li et al., 2010) sowie für Tumore des zentralen Nervensystems (Jansen et al., 2004: *Zelllinie*; Gao et al., 2007; Gao et al., 2009), des gastrointestinalen Stromas (Ding et al., 2012), der Haut (Matsuhashi et al., 2007) und der Nase (Wang, Y. et al., 2012) vor. Auch beim Bronchialkarzinom wurde der Expressionsverlust beziehungsweise die verminderte Expression von PDCD4 beobachtet (Chen et al., 2003: *NSCLC*; Göke et al., 2004: *SCLC*; Jansen et al., 2004: *NSCLC-Zelllinie*; Woenckhaus et al., 2006: *NSCLC*) und korrelierte überdies mit einer verstärkten Tumorprogression sowie einer schlechteren Prognose der Patienten (Chen et al., 2003).

PDCD4 war in dieser Arbeit jedoch weder im Tumor- noch im nicht-malignen Bronchus- und Lungengewebe methyliert. Vielmehr scheint PDCD4 über eine Reihe anderer Mechanismen reguliert zu werden:

Auf mitogene Stimuli hin wird das Protein PDCD4 durch die Proteinkinase S6K1 (p70<sup>S6K</sup>) phosphoryliert. Dies hat die Bindung von  $\beta$ TRCP, die Ubiquitinierung durch die Ubiquitin-Ligase SCF <sup>$\beta$ TRCP</sup> und schließlich die Degradierung von PDCD4 im Proteasom zur Folge. Durch den Abbau von PDCD4 ist dann die Proteintranslation und damit ein Zellwachstum möglich (Dorrello et al., 2006). Dieser Abbauweg wird offensichtlich durch die Proteinkinasen PKC $\delta$  und PKC $\epsilon$  (Nakashima et al., 2010) getriggert, die wiederum die PI3K/Akt/mTOR/p70<sup>S6K</sup>- sowie die MEK/ERK-Signalwege zu aktivieren scheinen (Schmid et al., 2008). Die Induktion der PI3K-Signalkaskade und damit die Degradation von PDCD4 wurde überdies in Anwesenheit von Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ), Interleukin 6 und 8 beobachtet (Schmid et al., 2011). Außerdem soll auch das Lipopolysaccharid LPS in der Lage sein, den PDCD4-Proteinspiegel zu beeinflussen (Yasuda et al., 2010; Sheedy et al., 2010). Somit dürfte die entzündliche Umgebungsreaktion eines Malignoms die tumorsupprimierende Funktion von PDCD4 beein-

trächtigen (Yasuda et al., 2010). Die Expression von PDCD4 kann aber auch über die Kaskade COX2/PGE2/IL-8 gehemmt werden (Nieves-Alicea et al., 2009).

Außerdem scheint die Serin/Threonin-Kinase Akt (Proteinkinase B) das Protein PDCD4 an zwei Serinresten zu phosphorylieren und dadurch dessen Fähigkeit, die Transaktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 zu inhibieren, einzuschränken (Palamarchuk et al., 2005), dessen Lokalisation innerhalb der Zelle zu beeinflussen (Mudduluru et al., 2007) und ebenfalls die Degradation von PDCD4 im Proteasom zu vermitteln (Schmid et al., 2008). Weiterhin ist die Kinase S6K2 auf Stimulation durch den Fibroblastenwachstumsfaktor FGF-2 hin in der Lage, PDCD4 zu phosphorylieren und dadurch dessen Degradation zu bewirken (Liwak et al., 2012).

Folglich könnten auch eine Störung des Abbauwegs im Proteasom oder eine Fehlregulation verschiedener Kinasen und deren Signalkaskaden zu einem Funktionsverlust von PDCD4 führen. Gerade dies wird von Kalinichenko et al., 2008 vermutet, die einerseits einen Verlust der PDCD4-mRNA beim Plattenepithelkarzinom der Lunge beobachteten, andererseits jedoch normale bis sogar deutlich erhöhte Spiegel des PDCD4-Proteins im Vergleich zum Normalgewebe nachwiesen. Dies verdeutlicht, dass die Regulation des Genprodukts nicht ausschließlich auf transkriptioneller und translationaler Ebene erfolgen muss. Vielmehr schließt die Arbeitsgruppe aus diesen Ergebnissen, dass das PDCD4-Protein durch andere Mechanismen wie die bereits von anderen Autoren beschriebene Phosphorylierung (Palamarchuk et al., 2005; Mudduluru et al., 2007) inaktiviert wird, es jedoch durch eine Störung des weiteren Abbaus innerhalb der Zelle in diesem funktionslosen Zustand zu akkumulieren scheint (Kalinichenko et al., 2008). Eine Ursache für den gestörten Abbau könnte der beim Bronchialkarzinom bereits beobachtete Verlust (He et al., 2005) von  $\beta$ TRCP1 sein (Kalinichenko et al., 2008). Im Widerspruch zu den Ergebnissen von Kalinichenko et al., 2008 stehen allerdings die Beobachtungen von Wei et al., 2009, die in ihrer Arbeit am Ovarialkarzinom durchaus eine Korrelation zwischen dem mRNA- und Proteinlevel von PDCD4 feststellten, wobei diese Divergenz durchaus methodisch bedingt sein könnte.

In zahlreichen Untersuchungen ließ sich zudem beobachten, dass die MikroRNA miR-21 die Expression von PDCD4 negativ beeinflusst und daher bei verschiedenen Tumorentitäten eine Rolle im Rahmen ihrer Entstehung und Progression zu spielen vermag (Chen et al., 2008: *Glioblastom*; Asangani et al., 2008: *Kolon*; Ramdas et al., 2009: *Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs*; Motoyama et al., 2010; Cao, Z. et al., 2012: *Magen*; Frankel et al., 2008; Zhu et al., 2008: *Mamma*; Reis et al., 2010: *Plattenepithelkarzi-*

*nome der Mundhöhle*; Hiyoshi et al., 2009: *Ösophagus*; Roldo et al., 2006: *endokrine Pankreastumoren*). Bei MikroRNAs handelt es sich um 21 bis 25 Basenpaare lange, einzelsträngige RNA-Moleküle, die durch Bindung im Bereich der 3'untranslatierten Region (3'UTR) von mRNAs deren Translation verhindern beziehungsweise deren Abbau induzieren können (Zeng et al., 2002; Zeng et al., 2003; Übersicht in: He et al., 2004; Übersicht in: Pillai et al., 2005). Mehreren Studien zufolge scheint miR-21 direkt an die 3'UTR der mRNA von PDCD4 zu binden und somit dessen Expression zu verhindern (Frankel et al., 2008; Zhu et al., 2008; Lu et al., 2008; Yao et al., 2011). Dass es sich hierbei sehr wahrscheinlich um einen nicht zu vernachlässigenden Mechanismus der Inaktivierung von PDCD4 und somit der Tumorentstehung handelt, lassen zudem die Untersuchungen von Lu et al., 2008 vermuten. Die Forschergruppe induzierte die neoplastische Transformation in miR-21-transfizierten und folglich in der Expression von PDCD4 kompromittierten JB6-Zellen und ergänzte dadurch die Experimente von Cmarik et al., die bereits 1999 die neoplastische Transformation dieser murinen epidermalen Zelllinie JB6 mit dem Verlust von PDCD4 in Verbindung brachten. Dass dieser Pathomechanismus auch beim Bronchialkarzinom eine Rolle spielen könnte, legen die folgenden Untersuchungen nahe: Hatley et al., 2010 verwendeten ein speziell für die Erforschung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms entwickeltes Mausmodell, um die Auswirkungen einer verstärkten Expression beziehungsweise eines Verlusts von miR-21 auf die Tumorentstehung in der Lunge zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass die Überexpression der microRNA allein wohl nicht für die Tumorentstehung ausreicht, diese jedoch verstärkt und niedrigere PDCD4-Protein-Spiegel zur Folge hat. MiR-21-negative Mäuse entwickelten hingegen signifikant weniger Lungentumore (Hatley et al., 2010). Zudem wurden im menschlichen Plattenepithelkarzinom der Lunge im Vergleich zum dazugehörigen Normalgewebe erhöhte miR-21-Level gemessen (Gao et al., 2011), was die Ergebnisse der Studie von Volinia et al. aus dem Jahr 2006, in der sich im Lungenkarzinom in Relation zu normalen Zellen ebenfalls eine Überexpression von miR-21 nachweisen ließ, bestätigt. Somit könnte der Expressionsverlust von PDCD4 auch beim Bronchialkarzinom durch Fehlregulation dieser microRNA zustande kommen. Doch auch andere microRNAs stehen im Verdacht, an der Regulation dieses Gens beteiligt zu sein. Hierzu zählen miR-103, miR-107 (Ramdas et al., 2009: *Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs*), miR-499-5p (Liu, X. et al., 2011: *Kolon*) und miR-183 (Li et al., 2010: *Leber*).

Des Weiteren soll TGF $\beta$ -1, ein Wachstumsfaktor, dessen Signalkaskade sowohl tumorsupprimierende als auch -fördernde Eigenschaften zugeschrieben werden (Übersicht in: Bachman et al., 2005; Übersicht in: Bieri et al., 2006) an der Regulation von PDCD4 be-

teiligt sein: Einerseits scheint TGF $\beta$ -1 die Expression von PDCD4 und damit die Apoptose in hepatischem Gewebe zu fördern (Zhang et al., 2006; Li et al., 2010), weshalb eine Reduktion des TGF $\beta$ -1-Rezeptors als Ursache für erniedrigte beziehungsweise fehlende PDCD4-Level bei Lebertumoren im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe in Erwägung gezogen wird (Zhang et al., 2006). Eine Verifizierung dieser Theorie steht jedoch bislang aus. Somit könnte TGF $\beta$ -1 in der Leber über Induktion von PDCD4 die Tumorentstehung verhindern. Andererseits ließ sich in Fibroblasten der fetalen Lunge und des Ovars die MikroRNA miR-21 durch TGF $\beta$ -1 hoch- und folglich PDCD4 herunterregulieren und damit die Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten induzieren (Yao et al., 2011). Dieser wird eine wichtige Rolle bei der Progression von Tumoren zugesprochen (Casey et al., 2008; Noma et al., 2008). Merline et al., 2011 zeigten, dass das Molekül Decorin ebenfalls PDCD4 hochregulieren kann – zum einen über die Interaktion mit Toll-like-Rezeptoren, zum anderen über die Inhibition von TGF $\beta$ -1. Offensichtlich sind sowohl TGF $\beta$ -1 als auch Decorin in der Lage, die Expression von PDCD4 zu beeinflussen. In der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT fand sich sowohl unter dem Einfluss von TGF $\beta$ -1 als auch unter jenem des epidermalen Wachstumsfaktors EGF und dem des Hepatozytenwachstumsfaktors HGF eine Suppression des PDCD4-Proteins (Matsushashi et al., 2007). Interessanterweise zeigten Wang, T. et al., 2012, dass TGF $\beta$ -1 in HaCaT-Zellen einerseits eine antiproliferative Wirkung entfaltet, durch gleichzeitige Induktion der microRNA miR-21, die wiederum PDCD4 zum Ziel hat, diesen Effekt jedoch auch begrenzt. Daher kann eine Dysregulation dieser Moleküle und ihrer Signalwege, wenn auch in den genannten Studien teils nicht an Epithelzellen und auch nicht in Bezug auf das Lungenkarzinom untersucht, als Ursache für den Verlust der Tumorsuppressorfunktion von PDCD4 nicht gänzlich außer Acht gelassen werden. Zudem wird anhand von TGF $\beta$ -1 deutlich, dass Signaltransduktoren wohl auch in Abhängigkeit vom Gewebe durchaus unterschiedliche, unter Umständen sogar gegensätzliche Wirkungen entfalten können.

Durch Charakterisierung der Promotorregion von PDCD4 gelang es, weitere Faktoren, die an der Regulation dieses Gens beteiligt sind, zu identifizieren (Leupold et al., 2012): Unter mehreren Promotorelementen und Bindeproteinen wie beispielsweise der CCAAT-Box und der Sp-Transkriptionsfaktoren sticht das Zinkfingerbindeprotein ZBP-89 besonders hervor, das als Aktivator des PDCD4-Promotors fungiert und dessen Überexpression beziehungsweise Repression zu einer verstärkten oder verminderten Expression von PDCD4-mRNA und -Protein führt (Leupold et al., 2012). Außerdem scheinen Histonmodifikationen einen Einfluss auf die Transkription von PDCD4 zu haben (Leupold et al., 2012).

Schließlich wurden auch Methylierungen der Promotorregion von PDCD4 beobachtet: Cao, Z. et al., 2012 wiesen diese in 36,4 Prozent der von ihnen untersuchten Magenkarzinome nach, fanden jedoch keine signifikante Korrelation zwischen dem Methylierungsstatus und dem mRNA- beziehungsweise Proteinlevel von PDCD4. Fan et al., 2007 beobachteten in einer HCC-Zelllinie durch artifizielles Knockdown der DNA-Methyltransferase DNMT1 und konsekutiver Demethylierung einer Vielzahl von Genen unter anderem einen Expressionsanstieg von PDCD4 um das 2,5-fache. Gleichzeitig gaben die Autoren dieser Untersuchung aber zu bedenken, dass unter Umständen andere, bislang unbekannte Mechanismen als die Aufhebung der Methylierung zu einem Expressionsanstieg führen könnten, da ein Teil der induzierten Gene keine CpG-Inseln in ihrer 5'-Region aufwiesen. Lediglich Gao et al., 2009 beobachteten an Gliomgewebe und Gliomzelllinien einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Methylierung von PDCD4 und dem Verlust der mRNA: So waren 47 Prozent der untersuchten Primärtumoren methyliert, wobei dies signifikant mit dem mRNA-Verlust korrelierte. Zudem ließ sich die Expression von PDCD4 durch das demethylierende Agens 5-Deoxy-Azacytidin sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene wiederherstellen. Mit PDCD4-transfizierte Zellen zeigten zudem eine gesteigerte Apoptose sowie reduzierte Proliferation und Koloniebildung. Patienten mit High-Grade-Gliomen (Grade III und IV) lebten zudem signifikant länger, wenn PDCD4 auf Proteinebene exprimiert war. Wen et al., 2007 hingegen versuchten in drei Mammakarzinomzelllinien die Expression dieses Gens durch 5-Deoxy-Azacytidin wiederherzustellen, blieben aber in ihrem Vorhaben erfolglos. Allerdings wurde anhand anderer Gene beobachtet, dass auch die Behandlung mit 5-Deoxy-Azacytidin die Reexpression nicht-methylierter Gene vermitteln kann, was auf die Aufhebung der methylierungsbedingten Repression anderer an der Regulation des untersuchten Gens beteiligter Faktoren zurückgeführt wird (Soengas et al., 2001; Tessema et al., 2009). Dies wäre auch eine mögliche Erklärung für die oben angesprochenen Beobachtungen von Fan et al., 2007. Somit darf die Demethylierung der CpG-Inseln von PDCD4 nicht automatisch als ausschließliche Ursache für die verstärkte Expression dieses Gens verantwortlich gemacht werden.

Allem Anschein nach wird PDCD4 als Bestandteil eines hochkomplexen Signaltransduktionsnetzwerks über eine Vielzahl und hier keineswegs in aller Vollständigkeit beschriebenen Mechanismen reguliert, wobei diese in Abhängigkeit vom Gewebe unterschiedlich ausgeprägt zu sein scheinen. Methylierungen spielen dabei, obwohl deren Existenz in einigen Studien diskutiert wird, eine untergeordnete Rolle und wurden beim Lungenkarzinom bislang offensichtlich noch nicht untersucht. Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge dürfte

diese epigenetische Veränderung beim Bronchialkarzinom zu vernachlässigen sein, ließ sich doch bei keinem der 42 untersuchten Patienten eine Methylierung nachweisen. Allerdings ist zu bedenken, dass nur ein kleiner Bereich von 81 Basenpaaren mit lediglich fünf CpG-Dinukleotiden innerhalb der Promotorregion von PDCD4 auf diese Modifikation hin untersucht wurde und somit nicht gänzlich auszuschließen ist, dass ein anderer Abschnitt von Methylierungen betroffen ist. Aufgrund der bisherigen Studienlage dürfte dies jedoch unwahrscheinlich sein.

### 6.2.5 Metastasis-Suppressor-1 (MTSS1)

Wie bereits anfangs angedeutet, ist die Funktion von MTSS1 – insbesondere im Hinblick auf Tumorerkrankungen – noch nicht eindeutig geklärt:

Den Ergebnissen von Dawson et al., 2012a zufolge fördert das Genprodukt von MTSS1 in frühen Stadien von Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches über die Aktivierung der EGF-Signalkaskade die Proliferation von Tumorzellen, bei zunehmender Zelldichte und Ausbildung von Zellkontakten hemmt es jedoch die Zellteilung zugunsten der Zelldifferenzierung. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen von Ma et al., 2007, die in frühen Stadien des hepatozellulären Karzinoms eine Überexpression von MTSS1 auf mRNA- und Proteinebene nachwiesen und daher folgerten, dass dieses Gen die Tumorentstehung begünstigen könnte. Dass der Expressionsverlust dieses Gens vor allem im Rahmen der Progression und Metastasierung von Malignomen relevant zu werden scheint, lassen eine Reihe von Untersuchungen vermuten, die eine fehlende beziehungsweise verminderte Expression von MTSS1 hauptsächlich in fortgeschrittenen Tumorstadien und in Metastasen (Wang et al., 2007a: *Blase*; Liu, K. et al., 2010: *Magen*; Xie et al., 2011: *Ösophagus*) beziehungsweise in Tumorzelllinien mit aggressiverem Wachstumsverhalten oder Metastasierungspotential (Lee et al., 2002: *Blase, Mamma, Prostata*; Mustafa et al., 2011: *Prostata*) beobachteten. Teilweise war dies auch mit einer signifikant schlechteren Prognose für die Patienten assoziiert (Parr et al., 2009; Liu, K. et al., 2010; Xie et al., 2011). In einigen Untersuchungen hemmte die Überexpression von MTSS1 hingegen das Zellwachstum, die Invasivität und Migration von Tumorzellen (Parr et al., 2009; Xie et al., 2011; Mustafa et al., 2011; Du et al., 2012). Was allerdings den Einfluss von MTSS1 auf die Adhäsionsfähigkeit von Zellen betraf, beobachteten diese Forschergruppen bisweilen gegensätzliche Effekte. Somit scheint MTSS1 vor allem in fortgeschrittenen Tumorstadien einen wachstumshemmenden Effekt auszuüben und der Verlust dieses Gens das Karzinomwachstum zu fördern.

Allerdings bezweifeln Bompard et al., 2005 und Wang et al., 2011 die metastasierungs- und tumorsupprimierende Funktion von MTSS1, da in ihren Arbeiten kein Unterschied in der Expression von MTSS1 zwischen nicht-metastasierten und metastasierten Zelllinien gefunden wurde (Bompard et al., 2005) beziehungsweise hohe Expressionsraten beim kolorektalen Karzinom signifikant mit einer schlechteren Prognose assoziiert waren (Wang et al., 2011). Gestützt wird diese Auffassung durch die Ergebnisse von Jahid et al., 2012, die im Primärtumor bei Patienten des Stadiums IV sowie bei Lebermetastasen hohe MTSS1-Spiegel nachwiesen. Chen et al., 2013 etablierten eine kolorektale Karzinomzelllinie mit hohem Lebermetastasierungspotential, in der MTSS1 hochreguliert war. Auch beim sehr aggressiven inflammatorischen Mammakarzinom wurde im Vergleich zum nicht-inflammatorischen Brustkrebs eine Überexpression von MTSS1 beobachtet (Bekhousche et al., 2011). Nixdorf et al., 2004 (*Blase*) stellen ebenfalls den hemmenden Einfluss von MTSS1 auf die Invasivität von Tumorzellen in Frage. Neuere Untersuchungen legen wiederum nahe, dass MTSS1 auch durch Eingreifen in den Zellzyklus als Tumorsuppressor fungieren könnte (Fan et al., 2012: *Leber*). Neben Tumoren oder Tumorzelllinien des Magens (Liu, K. et al., 2010), des Ösophagus (Xie et al., 2011), der Mamma (Parr et al., 2009), der Blase (Lee et al., 2002; Wang et al., 2007a; Du et al., 2011) und der Prostata (Mustafa et al., 2011) waren auch Karzinomzelllinien des gastroösophagealen Übergangs (van Duin et al., 2007) sowie B-Zell-Malignome (Yu et al., 2012) von einem Verlust beziehungsweise einer verminderten Expression von MTSS1 betroffen, was wiederum die tumorsupprimierende Funktion dieses Gens nahelegt. Auch beim Nierenkarzinom könnte MTSS1 als Tumorsuppressor fungieren (Du et al., 2012). In mehreren Lungenkarzinomzelllinien, die aus Adenokarzinomen chinesischer Patienten etabliert wurden, zeigte sich, dass MTSS1 im Vergleich zu Bronchialepithelzelllinien herunterreguliert war (Lam et al., 2006).

Letztlich kann aufgrund der bisherigen Forschungslage noch keine eindeutige Aussage bezüglich der tumorsupprimierenden beziehungsweise -fördernden Funktion von MTSS1 getroffen werden. Die unterschiedlichen Studienergebnisse lassen jedoch vermuten, dass dieses Gen in Abhängigkeit vom Gewebs- und Malignomtyp und -subtyp unterschiedliche Wirkungen entfaltet und folglich das Tumorwachstum beschleunigen, aber auch hemmen kann.

Somit ist nicht auszuschließen, dass auch beim Lungenkarzinom der Verlust von MTSS1 eine Rolle spielen könnte, wie es die bereits oben genannte Untersuchung von Lam et al., 2006 nahelegt. Außerdem zeigten Kim et al., 2013, dass es in mit dem Phorbol-ester Phor-



bol-12,13-dibutyrat (PDBu) versetzten Bronchialepithelzellen im Rahmen einer Entzündungsreaktion zur Hochregulation der Proteinkinase C und ihrer Isoformen und konsekutiv zu einem Expressionsanstieg von MTSS1 kam. Ob MTSS1 hier allerdings ein protektiver Effekt oder die Entzündungsreaktion unterstützende und letztlich auch malignominduzierende Funktion zukommt, wurde nicht untersucht. Beides wäre aber mit den bisherigen und oben ausgeführten Erkenntnissen zur Rolle dieses Gens im Rahmen von Tumorerkrankungen zu vereinbaren.

Methylierungen scheinen allerdings für den Expressionsverlust beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom weniger relevant zu sein, war diese epigenetische Veränderung doch in dieser Arbeit weder im Tumorgewebe selbst, noch im nicht-malignen Bronchus- und Lungengewebe zu finden. Ähnlich wie bei PDCD4 könnten andere Mechanismen zur Inaktivierung von MTSS1 im Rahmen der Karzinogenese und Tumورprogression beitragen:

So scheinen auch an der Regulation von MTSS1 microRNAs beteiligt zu sein, indem diese über die Hemmung der Translation dieses Gens die Zellproliferation, -migration oder auch -invasion und Metastasierung von Tumorzellen fördern. Dieses Phänomen wurde beim kolorektalen Karzinom für die microRNAs miR-135a (Zhou et al., 2012) und miR-23a (Jahid et al., 2012; Tang et al., 2012) beobachtet, für die microRNAs miR-182 beziehungsweise miR-182-5p beim Prostata- (Hirata et al., 2013), Ovarial- (Liu, Z. et al., 2012) und hepatozellulären Karzinom (Wang, J. et al., 2012). Die bereits oben genannte miR-135a soll aber auch über die Inaktivierung von MTSS1 an der Ausbildung von Portalvenenthrombosen im Rahmen des hepatozellulären Karzinoms beteiligt sein (Liu, S. et al., 2012).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation von MTSS1 wurde beim Magenkarzinom untersucht: Offensichtlich ist das Ringfinger-Protein RNF180, das selbst Ziel von Methylierungen zu sein scheint, in der Lage, MTSS1 zu induzieren und zumindest teilweise dadurch seine wachstumshemmende Wirkung zu entfalten (Cheung et al., 2012). Ein ähnlicher Sachverhalt wurde für den T-Box Transcription Factor 5 (TBX5) beim Kolonkarzinom untersucht (Yu et al., 2010). Anhand einer Lungenkarzinomzelllinie ließ sich zudem beobachten, dass wohl auch das Connexin 43 an der Hochregulation von MTSS1 beteiligt ist (Zhao et al., 2011). Somit könnten sich auch Störungen in der Regulation von RNF180 und TBX5 oder auch Connexin 43 auf die Expression und damit tumorsupprimierende Funktion von MTSS1 auswirken. Ob dieser Zusammenhang auch auf andere Tumorentitäten übertragbar ist, muss jedoch erst untersucht werden. Neueren Erkenntnissen zufolge

scheint MTSS1 auch ein Downstream-Target von Vasohibin-1 (VASH1) zu sein (Affara et al., 2013).

Doch auch Methylierungen dürfen als Inaktivierungsmechanismus von MTSS1 nicht gänzlich außer Acht gelassen werden, da doch der Promotor von MTSS1 innerhalb einer CpG-Insel (Utikal et al., 2006) liegt. Untersuchungen an Prostatakarzinomzelllinien sowie an einem Prostataprimärtumor zeigten, dass der Methylierungsstatus mit dem Expressionsverlust dieses Gens korrelierte und durch Demethylierungsversuche die Reexpression induziert werden konnte (Utikal et al., 2006). Ähnliches wurde für das Magenkarzinom beobachtet (Yamashita et al., 2006). Auch beim Mammakarzinom wurden Methylierungen der Promotorregion nachgewiesen (Kamalakaran et al., 2009). Allerdings gelang es Nixdorf et al., 2004 nicht, in Blasenkarzinomzelllinien durch 5-Deoxy-Azacytidin die Expression von MTSS1 wieder herzustellen. Wie bereits bei der Diskussion von RASAL1 sei jedoch auch an dieser Stelle darauf verwiesen, dass sich Zelllinien von Primärgewebe in ihren Eigenschaften unterscheiden können. Außerdem ist der bei PDCD4 erläuterte Aspekt zu Demethylierungsexperimenten zu berücksichtigen.

MTSS1 ist zudem Zielgen der DNA-Methyltransferase 3B (DNMT3B). Interessanterweise hemmt DNMT3B die Expression von MTSS1 beim hepatozellulären Karzinom jedoch nicht – wie für andere Tumorsuppressorgene beobachtet – durch die Übertragung von Methylgruppen, sondern methylierungsunabhängig über die direkte Bindung an dessen 5'-Region (Fan et al., 2012).

Wie die Ausführungen zeigen, existieren grundsätzlich verschiedene Regulationsmechanismen der Expression und Funktion von MTSS1, wobei sich diese durchaus in Abhängigkeit von Gewebe- und Malignomart unterscheiden. Auch Methylierungen dürften hierbei zum Expressionsverlust dieses Gens führen (Utikal et al., 2006; Yamashita et al., 2006; Kamalakaran et al., 2009). Da sich in dieser Untersuchung weder im Tumor noch im nicht-malignen Lungen- und Bronchialgewebe diese epigenetische Veränderung fand, ist der methylierungsabhängige Expressionsverlust beim Bronchialkarzinom jedoch in Frage zu stellen. Einschränkend muss auch bei MTSS1 darauf hingewiesen werden, dass in dieser Arbeit nur ein Ausschnitt von 81 Basenpaaren innerhalb des Promotorbereichs von MTSS1 auf diese Veränderung hin untersucht wurde und bislang wohl keine weiteren Studien zur Methylierung von MTSS1 beim Bronchialkarzinom existieren. Somit könnten auch andere Bereiche der Transkriptionsstartstelle von Methylierungen betroffen sein. Dies ist insofern nicht gänzlich unwahrscheinlich, beobachteten doch bereits Utikal et al., 2006, dass nicht die gesamte CpG-Insel der Promotorregion von MTSS1 gleichmäßig von Methylierungen

betroffen war, sondern hauptsächlich der 5'-gelegene Bereich. Außerdem ist zu bedenken, dass Methylierungen offensichtlich auch in tumorspezifischer Art und Weise auftreten (Costello et al., 2000) und somit die Ergebnisse nicht ohne Weiteres von einer Tumorentität auf eine andere übertragen werden können.

Zudem ließ sich in den meisten der hier zitierten Studien ein Expressionsverlust von MTSS1 erst in fortgeschrittenen Tumorstadien insbesondere bei Metastasierung oder aber in Karzinomzelllinien mit aggressivem Wachstumsverhalten nachweisen. In dieser Arbeit wurde jedoch hauptsächlich Gewebe von Patienten mit niedrigeren Tumorstadien untersucht (zwei Drittel der Patienten befanden sich in Stadium I und II). Lediglich 3 der 42 Studienteilnehmer wiesen Fernmetastasen auf. Folglich ist nicht auszuschließen, dass im hier vorliegenden Patientengut ein Expressionsverlust von MTSS1 noch nicht zum Tragen kommt.

### **6.2.6 Tumor-Suppressor-Candidate-3 (TUSC3)**

In zahlreichen Studien wurden genetische und epigenetische Veränderungen der Genregion von TUSC3 8p22 in verschiedenen Tumorgeweben untersucht. Bova et al. wiesen 1996 erstmals mit Hilfe des Mikrosatellitenmarkers D8S1992, der innerhalb der Gensequenz von TUSC3 liegt, die homozygote Deletion dieses Gens im metastasierten Prostatakarzinom nach. Horak et al. konnten in ihren Untersuchungen von 2012 und 2014 den Expressionsverlust von TUSC3 auch auf Proteinebene nachvollziehen und zeigten außerdem, dass dessen Herunterregulation in Prostatakarzinomzelllinien zu einem Proliferationsvorteil führte. Zusätzlich werden Methylierungen bei Prostataprimärtumoren beschrieben (Kekeeva et al., 2007; Horak et al., 2014). Diese Beobachtungen lassen sich zudem durch eine Reihe von Untersuchungen zu Veränderungen von 8p22 in diesem Karzinom stützen (Bova et al., 1993; Cunningham et al., 1996; Deubler et al., 1997; Oba et al., 2001; Hughes et al., 2006). Auch im Ovarialkarzinom konnte sowohl ein Expressionsverlust von TUSC3 (Pils et al., 2005) als auch die Methylierung der Promotorregion mit konsekutiver Herunterregulation der zugehörigen mRNA (Pils et al., 2013) sowie Loss of Heterozygosity beziehungsweise eine allelische Imbalance von 8p22 (Emi et al., 1992; Wright et al., 1998; Pribill et al., 2001) nachgewiesen werden. Auch bei diesem Karzinom scheint der Verlust dieses Gens mit einem Proliferationsvorteil verknüpft zu sein (Vaňhara et al., 2013). In der kolorektalen Normalmukosa soll eine altersabhängige Methylierung (Ahuja et al., 1998; Belshaw et al., 2008), in entartetem Gewebe sogar eine Hypermethylierung von TUSC3 vorliegen (Ahuja et al., 1998; Belshaw et al., 2008; Suehiro et al., 2008). Zudem ließ sich

ein methylierungsabhängiger Expressionsverlust in kolorektalen Tumorzelllinien (MacGrogan et al., 1996) sowie eine signifikant verminderte Expression in Primärtumoren (Andersen et al., 2007) beobachten. Der Verlust der Genregion 8p22 wird ebenfalls beschrieben (Emi et al., 1992; Fujiwara et al., 1993; Gustafson et al., 1996). Bei Patienten mit Colitis ulcerosa zeigte sich eine verstärkte Methylierung der Promotorregion von TUSC3 (Arasaradnam et al., 2010). Im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Zemlyakova et al., 2003b) sowie in einer Lungenkarzinomzelllinie (MacGrogan et al., 1996) gelang ebenfalls der Methylierungsnachweis dieses Gens. In einer Studie am Bronchialkarzinom war TUSC3 im Vergleich zum Normalgewebe herunterreguliert (Woenckhaus et al., 2006). Darüber hinaus werden auch bei dieser Tumorentität Deletionen der Region 8p22 beschrieben (Emi et al., 1992; Virmani et al., 1998; Wistuba et al., 1999b). Neuesten Erkenntnissen zufolge scheint die Überexpression von TUSC3 beim Glioblastom die Proliferations- und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen zu hemmen (Jiang et al., 2016). Zudem konnte auch bei dieser Tumorentität ein Zusammenhang zwischen der Promotormethylierung und dem Expressionsverlust von TUSC3 festgestellt werden (Laffaire et al., 2011; Jiang et al., 2016). Um weitere Tumoren und Tumorzelllinien, bei denen sich Expressionsveränderungen beziehungsweise genetische und epigenetische Modifikationen von TUSC3 fanden, handelt es sich beim Pankreas- (Levy et al., 1999; Bashyam et al., 2005; Cooke et al., 2008; Birnbaum et al., 2011), Nierenzell- (McRonaldd et al., 2009), hepatozellulären (MacGrogan et al., 1996), Mamma- (Zemlyakova et al., 2003a; Cooke et al., 2008), Blasen- (Ohgaki et al., 1999) und papillären Schilddrüsenkarzinom (Huang et al., 2001; Chung et al., 2012). Ebenfalls betroffen sind das Zervixkarzinom samt dessen Vorstufen (Kekeeva et al., 2006; Kloth et al., 2007) sowie Tumoren des Kopf- und Halsbereichs (Alonso Guervós et al., 2007; Alonso Guervós et al., 2009; Álvarez Marcos et al., 2010; Franco Gutiérrez et al., 2012; Ribeiro et al., 2014). Eine Studie liefert Hinweise dafür, dass TUSC3 zur Unterscheidung zwischen akuter lymphatischer Leukämie (ALL) und akuter myeloischer Leukämie (AML) beitragen könnte, da das Gen in lymphatischen Leukämiezellen im Gegensatz zu myeloischen eine Hypermethylierung aufwies (Scholz et al., 2005). Auch bei anderen Malignomen des blutbildenden Systems wie dem multiplen Myelom (Li et al., 2007) und follikulären Lymphom (O’Riain et al., 2009) wurde ein Expressionsrückgang beziehungsweise eine Methylierung von TUSC3 beobachtet.

Eine weitere Untersuchung zeigte erstmalig einen potentiellen Zusammenhang zwischen der Deletion von TUSC3 und rheumatoider Arthritis auf (Alonso et al., 2010). Neueren Erkenntnissen zufolge scheint der Verlust von TUSC3 auch für eine nicht-syndromale Form

der mentalen Retardierung (NSMR), die einem autosomal-rezessiven Erbgang folgt, verantwortlich zu sein (Garshasbi et al., 2008; Molinari et al., 2008; Khan et al., 2011; Garshasbi et al., 2011). Ähnliches wurde für eine syndromale Form der mentalen Retardierung nachgewiesen (Loddo et al., 2013). Außerdem war TUSC3 von einer Deletion im Bereich von Chromosom 8p22 bei einem an Schizophrenie erkrankten Patienten betroffen (Need et al., 2009).

Aufgrund all dieser Erkenntnisse muss die tumorsupprimierende Funktion von TUSC3 durchaus in Betracht gezogen werden. Methylierungen als Inaktivierungsmechanismus dieses Gens – diese wurden schließlich bei verschiedenen Tumorentitäten beobachtet – dürften in diesem Zusammenhang ebenfalls von Bedeutung sein. Auch beim Lungenkarzinom könnte der Verlust dieses Gens der bisherigen Studienlage zufolge, insbesondere durch Methylierung der Promotorregion, eine Rolle spielen.

In dieser Arbeit lag eine deutliche Methylierung der Promotorregion von TUSC3 sowohl im nicht-malignen Bronchial- (67,9%, (19/28)) und Lungengewebe (31%, (13/42)) als auch im Tumorgewebe (59,5%, (25/42)) vor. Damit weist TUSC3 im Vergleich zu den übrigen in dieser Studie untersuchten Genen die höchste Rate dieser epigenetischen Veränderung auf. Dabei war bei 16 Patienten mit Methylierung im Tumor diese ebenfalls in nicht-malignem Gewebe zu finden. Allerdings kam die Modifikation auch isoliert im Lungen- oder Bronchialgewebe vor (insgesamt 11 Fälle). Bei einigen Patienten war jedoch eine Untersuchung von Bronchialepithel nicht möglich.

Wie oben bereits erwähnt berichten Zemlyakova et al., 2003b von einer Methylierung von TUSC3 beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom russischer Patienten in 17,6 Prozent (9/51) der Fälle. Lungennormalgewebe wurde allerdings nicht untersucht und das Methylierungslevel lediglich mit dem von Lymphozyten gesunder Probanden verglichen. Ein Cut-off-Wert, ab dem eine Methylierung als gegeben angesehen wird, wird nicht genannt. Ein Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Parametern konnte nicht hergestellt werden. Das Ergebnis dieser Forschergruppe bleibt zudem hinter den Methylierungsraten im Tumorgewebe dieser Arbeit zurück. Auch in einer Lungenkarzinomzelllinie ließ sich die Methylierung dieses Gens nachweisen (MacGrogan et al., 1996).

Erstaunlicherweise wiesen die hier untersuchten Patienten, bei denen eine Methylierung von TUSC3 im Tumorgewebe vorlag, ein signifikant besseres Überleben im Beobachtungszeitraum auf als diejenigen Studienteilnehmer, bei denen das Gen nicht methyliert war (Kaplan-Meier-Funktion, Logrank-Test  $p = 0,013$ ). Auch im exakten Test nach Fisher

fand sich eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Methylierungsstatus im Tumorgewebe und dem Überleben der Probanden ( $p = 0,039$ ). Eine ähnliche Tendenz ließ sich für das Bronchus- und Lungengewebe nachweisen, jedoch ohne statistische Signifikanz ( $p = 0,67$  bzw.  $p = 0,28$ ).

Zusätzlich zeigte sich ein signifikant positiver Zusammenhang zugunsten der Methylierung des Tumorgewebes in den niedrigeren Tumorstadien T1a, T1b und T2a im Vergleich zu den Stadien T2b, T3 und T4 ( $p = 0,008$ ). Verzichtete man allerdings auf die Unterteilung der T-Stadien in a und b, fand sich diese Korrelation nicht mehr ( $p = 0,235$ ). Für die Stadieneinteilung I bis IV ließ sich ein signifikanter Zusammenhang mit dem Methylierungsstatus im Bronchialepithel darstellen, der sich nach Unterteilung der Stadien in A und B jedoch nicht mehr nachvollziehen ließ. Dies könnte beispielsweise auf die geringe Fallzahl zurückzuführen sein. Vielleicht spielt die Methylierung von TUSC3 beim Bronchialkarzinom auch lediglich in Bezug auf die Krebsentstehung, nicht aber bei der Progression des Krebsleidens eine Rolle. Geht man davon aus, dass die Methylierung der Promotorregion zur Inaktivierung von TUSC3 führt, wäre demnach der Expressionsverlust dieses Gens ein eher frühes Ereignis im Rahmen der Tumorerkrankung. Bei 11 (26,2%) Patienten fand sich schließlich lediglich im Bronchial- und Lungengewebe eine Methylierung, während dies im Tumor nicht der Fall war. Allerdings ist auch zu bedenken, dass sich die Mehrzahl der in die Studie eingeschlossenen Patienten (80,9%) in den Tumorstadien T1 und T2, davon wiederum 70 Prozent in T1a und T2a, befanden und daher allein aufgrund des weniger fortgeschrittenen Tumorleidens eine bessere Überlebenschance aufwiesen. Da in dieser Analyse potentielle Confounder unberücksichtigt blieben, muss also nicht unbedingt ein Kausalzusammenhang zwischen dem besseren Überleben und der Methylierung von TUSC3 trotz signifikanter Korrelation dieser Parameter vorliegen. Ähnliches gilt für den Aspekt, dass ausschließlich bei R0-resizierten Patienten diese epigenetische Veränderung vorlag ( $p = 0,021$ ). Allerdings konnten lediglich vier der 42 Studienteilnehmer nicht in sano reseziert werden, so dass die Stichprobe hierfür denkbar klein ist.

Die Tatsache, dass Patienten mit Methylierung von TUSC3 ein besseres Outcome aufwiesen und diese Veränderung in niedrigeren Tumorstadien häufiger als in höheren vorlag, widerspricht den Ergebnissen einer Vielzahl von Studien, wonach TUSC3 als Tumorsuppressorgen fungieren und sein Verlust – mitunter durch Methylierungen verursacht – durchaus mit einer schlechteren Prognose beziehungsweise fortgeschritteneren Tumorstadien assoziiert sein soll. Denn unter anderem wurde der Verlust von TUSC3 erstmals in einem metastasierten Prostatakarzinom nachgewiesen (Bova et al., 1996). Pils et al. be-

obachteten in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2005 beim Ovarialkarzinom gerade in höheren Tumorstadien und entdifferenzierteren Tumoren den Expressionsverlust von TUSC3, womit dieses Ereignis als eher spät im Rahmen der Krebserkrankung anzusiedeln wäre. In Bezug auf das Überleben der Patienten wurde das Signifikanzniveau damals knapp verfehlt. In einer neuen Untersuchung aus dem Jahr 2013 konnten Pils et al. zwar keinen Unterschied in Bezug auf den Expressionsverlust zwischen den verschiedenen Tumorstadien mehr nachweisen, dafür beschreiben sie einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus und konsekutiven mRNA-Expressionsrückgang von TUSC3 und dem schlechteren Überleben der Studienteilnehmer. Durch Demethylierungsversuche gelang ihnen zusätzlich, die Expression der mRNA wiederherzustellen. Außerdem hemmte eine artifizielle Reexpression dieses Gens in vitro die Zellproliferation sowie die Adhäsion von Tumorzellen an Kollagen I. Auch beim Larynx- und Pharynxkarzinom wurde im fortgeschrittenen, insbesondere im metastasierten Stadium häufiger die Deletion von TUSC3 beobachtet. Zudem korrelierte diese signifikant mit einem schlechteren Überleben der Patienten (Alonso Guervòs et al., 2007).

Einen weiteren Aspekt stellt die Methylierungshäufigkeit in Abhängigkeit vom Alter dar: In dieser Arbeit war TUSC3 sowohl im Bronchus- ( $> 60$  Jahre 81,8%,  $\leq 60$  Jahre 58,8%,  $p = 0,249$ ) als auch im Tumorgewebe ( $> 60$  Jahre 63,2%,  $\leq 60$  Jahre 56,5%,  $p = 0,757$ ) bei Patienten mit Erstdiagnose jenseits des 60. Lebensjahres geringfügig häufiger methyliert, allerdings ohne statistische Signifikanz. Für das Lungengewebe fand sich jedoch kein Unterschied in der Methylierungshäufigkeit. Ältere Patienten lebten zudem signifikant länger ( $p = 0,034$ ) als solche, die in jüngeren Jahren an diesem Malignom erkrankten, was darauf hinweisen könnte, dass sich auch die Tatsache des höheren Lebensalters günstig auf die Prognose auswirkt. Der Trend der altersabhängigen Methylierung wurde von Ahuja et al., 1998 bereits für die kolorektale Normalmukosa und als genspezifisch beschrieben. Zusätzlich beobachtete diese Arbeitsgruppe im Allgemeinen auch eine stärkere Methylierung von adenomatösen Polypen (80%) und Karzinomgewebe (83%) im Vergleich zu dazugehörigem nichtentartetem Gewebe (67%), wohingegen in der hier vorliegenden Arbeit Bronchialgewebe (67,9%) häufiger als Tumorgewebe (59,5%) diese epigenetische Veränderung aufwies. Xu et al., 2004 wiederum konnten keinen Methylierungsunterschied zwischen kolorektaler Normalmukosa und Tumorgewebe beobachten, jedoch untersuchten sie chinesische Patienten, während Ahuja et al., 1998 ihre in den USA rekrutierten. Folglich könnten ethnische Unterschiede für die divergenten Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen in Betracht kommen. Der Effekt der altersabhängigen Methylierung von

TUSC3 wurde zudem von Belshaw et al., 2008 (*kolorektale Mukosa*) beschrieben. Auch beim Glioblastom ließ sich bei Patienten jenseits des 40. Lebensjahres diese Veränderung häufiger beobachten (Li et al., 1998). Einer neueren Untersuchung zufolge ist auch aus Vollblut gewonnene DNA von diesem Prozess betroffen (Tahara et al., 2013).

In Bezug auf das Geschlecht, das Rauchverhalten, den Lymphknotenbefall, die Fernmetastasierung, das Grading und die Histologie ließ sich in der vorliegenden Studie kein signifikanter Zusammenhang mit einer Methylierung von TUSC3 herstellen, was mitunter auf die relativ kleine Stichprobengröße zurückzuführen sein dürfte.

Generell ist zu bedenken, dass die Ergebnisse in Bezug auf die Methylierung nicht ohne Weiteres von einer Gewebeart oder auch Tumorentität auf eine andere übertragen werden können. Dies machen beispielsweise die Ergebnisse von Ahuja et al., 1998 deutlich, die in kolorektalem Normalgewebe (74%) Methylierungen von TUSC3 häufiger als im zugehörigem Lebergewebe (17%) nachwiesen und daher davon ausgehen, dass die altersabhängige Methylierung durchaus von Gewebefaktoren abhängig sein dürfte. Die Tatsache, dass sich die Methylierungsmuster zwischen der akuten lymphatischen und myeloischen Leukämie signifikant unterscheiden, spricht für eine tumorspezifische Methylierung (Scholz et al., 2005), wie sie bereits von Costello et al., 2000 postuliert wurde. Schließlich wurde in zwei Arbeiten zum papillären Schilddrüsenkarzinom sogar eine Überexpression von TUSC3 beobachtet (Huang et al., 2001; Chung et al., 2012). Beide Arbeiten geben jedoch keine Hinweise auf die Funktion von TUSC3 im Rahmen dieser Tumorerkrankung. In neueren Untersuchungen zu Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs wurde zwar in Primärtumoren ein Genverlust von TUSC3 beschrieben, allerdings konnte in zugehörigen Lymphknotenmetastasen mitunter auch dessen Gewinn nachgewiesen werden (Alonso Guervòs et al., 2009; Álvarez Marcos et al., 2010). Doch auch in Vorläuferläsionen (Álvarez Marcos et al., 2010) sowie in Erst- und vor allem Zweitumoren (Franco Gutiérrez et al., 2012) wurde ein Gewinn von TUSC3 beobachtet. Diese Ergebnisse stützen zum einen die These einer gewebes- und tumorspezifischen Regulation dieses Gens, zum anderen lassen sie auch – insbesondere in Hinblick auf das bessere Outcome der Lungenkarzinompatienten mit Methylierung dieser Arbeit – die tumorsupprimierende Funktion von TUSC3 in Frage stellen.

Schließlich könnte die Methylierung von TUSC3 im Bronchialkarzinom lediglich einen Kollateralschaden im Rahmen von Methylierungen anderer Gene, zum Beispiel solcher, die sich auch in der Genregion 8p22 befinden, darstellen, wie schon von MacGrogan et al., 1996 und auch Levy et al., 1999 vorgeschlagen. Die beschriebene Methylierung hätte



somit auf die Tumorentstehung und Progression keinen wesentlichen Einfluss. Hierzu müsste erstens nachgewiesen werden, ob die Methylierung dieses Gens auch tatsächlich einen Expressionsverlust bis hin zur Proteinebene zufolge hat, und zweitens, ob sich dieser wiederum auch tatsächlich auf die Krebsentstehung und das Fortschreiten der Krankheit auswirkt. Ahuja et al., 1998 geben zu bedenken, dass bei In-Vitro-Versuchen wohl kein Wachstumsvorteil von kolorektalen Karzinomzellen durch die Methylierung von TUSC3 beobachtet werden konnte, während Pils et al., 2013 einen hemmenden Einfluss dieses Gens auf die Zellproliferation zeigen konnten. Allerdings ist fraglich, ob sich das Ergebnis eines In-Vitro-Experiments auf die Bedingungen in vivo und von einer Tumorentität auf eine andere übertragen lässt.

Zudem liefern einige Studien zu anderen Genen Hinweise darauf, dass eine Methylierung der Promotorregion nicht automatisch auch einem Silencing des Gens durch Expressionsverlust gleichkommt (Xu et al., 2004; Tessema et al., 2009; Pasini et al., 2012). Ähnliches wurde auch für den Genverlust von TUSC3 gezeigt: So konnte in fünf Zervixkarzinomzelllinien eine Deletion dieses Gens nachgewiesen werden. Allerdings wirkte sich dies nur in zwei Zelllinien auch auf dessen Expression, die mittels qRT-PCR untersucht wurde, aus (Kloth et al., 2007). Daraus folgert diese Arbeitsgruppe, dass Deletionen aber auch Amplifikationen nicht zwangsläufig zu einer Änderung der Genexpression führen. Jedoch ist anzumerken, dass hier die Expression nur auf mRNA-Ebene und nicht zusätzlich auch auf Proteinebene untersucht wurde.

Unter Umständen führt eine Methylierung nur in bestimmten Abschnitten der Promotorregion zu einer Geninaktivierung. So beobachteten Deng et al., 2002 in ihrer Analyse von hMLH1 beim kolorektalen Karzinom, dass die Methylierung der proximalen, nicht aber der distalen Promotorregion zu einem Expressionsverlust führte. Dies könnte auch ein Grund dafür sein, weshalb oben genannte Studien trotz dieser epigenetischen Veränderung eine Expression der untersuchten Gene nachwiesen. Als weitere Ursache dafür ist das bereits bei MGMT angesprochene Argument von Mikeska et al., 2007, dass die Methylierung der im untersuchten DNA-Abschnitt liegenden CpG-Dinukleotide nicht automatisch auf die gesamte Promotorregion übertragen werden kann, zu berücksichtigen. Folglich ist nicht auszuschließen, dass die Methylierung der in dieser Arbeit untersuchten DNA-Sequenz von TUSC3 für die Transkriptionshemmung irrelevant ist, weshalb weitere Promotorbereiche dieses Gens analysiert werden sollten.

Außerdem scheinen Methylierungen, wie von Rauch et al., 2009 beobachtet, auch einen Regulationsmechanismus für die Nutzung alternativer Promotoren darzustellen. Zwar fin-

det sich in der Literatur zu TUSC3 kein Hinweis auf die Existenz von mehr als einem Promotor, allerdings ist diese damit auch nicht ausgeschlossen, weshalb dieser Aspekt Beachtung verdienen sollte.

Schließlich werden in der Literatur immer wieder Zweifel geäußert, ob TUSC3 tatsächlich als Tumorsuppressor fungiert: Obwohl Patienten mit Colitis ulcerosa, die bekanntlich ein höheres Risiko für kolorektale Karzinome haben (Übersicht in: Ullman et al., 2011; Übersicht in: Castaño-Milla et al., 2014), im Vergleich zur Mukosa eines gesunden Vergleichskollektivs deutlich stärkere Methylierungsraten von TUSC3 aufwiesen, ließ sich kein Zusammenhang dieser epigenetischen Veränderung mit der Krankheitsdauer oder auch -aktivität feststellen, weshalb die Autoren dieser Studie den Einfluss der Methylierung von TUSC3 auf die Entstehung kolorektaler Karzinome im Rahmen dieser chronisch-entzündlichen Darmerkrankung bezweifeln (Arasaradnam et al., 2010). Garshasbi et al., 2008 identifizierten TUSC3-Defekte als Ursache einer nicht-syndromalen Form der mentalen Retardierung, konnten aber bei den betroffenen Individuen keine erhöhte Krebsneigung feststellen. Auch Bradley et al., 2010 beobachteten bei Patienten ohne funktionsfähiges TUSC3 keine erhöhte Tumorzinzidenz. Letzlich stellen auch die Untersuchungsergebnisse von Gu et al., 2016 die tumorsupprimierende Funktion dieses Gens in Frage: Zum einen fand die Forschergruppe in kolorektalen Karzinomen im Vergleich zu dazugehörigem Normalgewebe eine Überexpression von TUSC3 auf mRNA- und Proteinebene. Zum anderen förderte eine gesteigerte Expression von TUSC3 die Epithelial-to-Mesenchymal-Transition (EMT), die Proliferations-, Migrations- und Invasionsfähigkeit sowie das Tumorzwachstum kolorektaler Karzinomzelllinien, wobei die Herunterregulation von TUSC3 gegenteilige Effekte bewirkte (Gu et al., 2016). Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass letztere Erkenntnisse teilweise durch In-Vitro-Experimente gewonnen wurden.

Außerdem wurde auch bei anderen Genen, deren Funktion als Tumorsuppressorgen diskutiert wird, beobachtet, dass die Methylierung der Promotorregion signifikant mit einem besseren Überleben der am nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom erkrankten Patienten korrelierte (Gu et al., 2006: *TIMP3*, *CDH1*; Castro et al., 2010: *TIMP3*, *SFRP5*). Gu et al., 2006 vermuten sogar, dass sich durch Nikotinkonsum der Effekt der Promotormethylierung auf die jeweiligen Moleküle verändert. Beweise hierfür sowie eine plausible Erklärung für den Überlebensvorteil durch Methylierung bleiben jedoch sowohl Gu als auch Castro und ihre Arbeitsgruppen schuldig.

Die Rolle von TUSC3 im Rahmen des Bronchialkarzinoms lässt sich also nicht eindeutig klären: Einerseits könnte TUSC3 vor allem bei der Entstehung und weniger bei der

Progression dieser Erkrankung von Bedeutung sein, andererseits ist nicht sicher zu beurteilen, ob seine Methylierung nicht letztlich als Kollateralschaden entsteht – werden doch in dessen Genregion mehrere potentielle Tumorsuppressorgene vermutet (Jenkins et al., 1998; Ishii et al., 1999; Kahng et al., 2003; Pils et al., 2005; Huang et al., 2010) – und somit TUSC3 mit oder ohne epigenetische oder genetische Veränderung überhaupt Einfluss auf dieses Karzinomleiden nimmt. Schließlich war bei einem Teil der Patienten dieser Arbeit ausschließlich benignes Gewebe methyliert (26,2%, (11/42)), nicht jedoch der Tumor. Insbesondere da sich die Ergebnisse offensichtlich nicht ohne Weiteres von einer Tumorentität auf eine andere übertragen lassen, sind hierzu weitere Untersuchungen explizit am nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom nötig: Dies beinhaltet die Erforschung der tatsächlichen Auswirkung der Methylierung auf die Expression von mRNA und Protein sowie dessen Aktivität ebenso wie die detaillierte Überprüfung des Einflusses von TUSC3 auf Entstehung und Verlauf des Tumorleidens. In diesem Zusammenhang wäre zudem interessant zu überprüfen, ob sich auch bei Patienten ohne Bronchialkarzinom – beispielsweise im Rahmen von Obduktionen – eine Methylierung von TUSC3 in Bronchus- und Lungengewebe findet. Somit ließe sich näher abschätzen, ob diese epigenetische Veränderung tatsächlich einen Risikofaktor für die Erkrankung an diesem Malignom darstellt. Unter Umständen könnte dann auch die Untersuchung des Methylierungsstatus von TUSC3 im Sputum zur Diagnostik und insbesondere zur Früherkennung dieses Malignoms herangezogen werden.

Die Tatsache, dass diese Modifikation von TUSC3 im Tumor mit einem besseren Überleben verknüpft war, könnte jedoch unter Umständen und gegebenenfalls in Kombination mit weiteren Markern zur Vorhersage der Prognose der Patienten beitragen.

### **6.3 CpG Island Methylator Phenotype (CIMP)**

Wie bereits eingangs erläutert prägten Toyota et al., 1999 den Begriff des „CpG island methylator phenotype (CIMP)“, nachdem sie beim kolorektalen Karzinom die gleichzeitige Methylierung mehrerer Gene beobachteten. Seither wurde dieser Begriff auch beim Lungenkarzinom immer wieder ins Spiel gebracht, wobei dieser von verschiedenen Autoren durch eine unterschiedliche Anzahl von Genen, die methyliert vorliegen müssen, definiert wird (Suzuki et al., 2006; Liu, Z. et al., 2008; Liu, Z. et al., 2010; Shinjo et al., 2012).

Auch in dieser Arbeit waren – betrachtet man alle drei untersuchten Gewebearten – bei zwölf Patienten mehr als ein Gen von dieser Modifikation betroffen. Bei Beschränkung auf

das Tumorgewebe war dies bei fünf Patienten für zwei und bei einem Patienten für drei Gene der Fall. Allerdings fällt es einerseits aufgrund der geringen Zahl von sechs Patienten mit Methylierung mehrerer Gene im Tumor schwer, die Existenz eines „CpG island methylator phenotype“ zu postulieren. Andererseits dürfte für die Definition dieses Phänotyps, die gleichzeitige Methylierung von zwei, maximal drei Genen nicht ausreichen, auch wenn dies von Suzuki et al., 2006 und Shinjo et al., 2012 so gehandhabt wird. Vielmehr müsste dazu sowohl eine größere Anzahl von Genen als auch eine deutlich höhere Fallzahl auf diese epigenetische Veränderung hin untersucht werden. Dabei dürfte es durchaus interessant sein, MGMT, vor allem aber RASSF1A und TUSC3, unter die Kandidatengene aufzunehmen.

## 7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Tumormaterial sowie nicht-malignes Lungen- und – soweit verfügbar – benignes Bronchusgewebe von 42 am Bronchialkarzinom erkrankten Patienten auf die Methylierung der sechs Gene MGMT, RASSF1A, RASAL1, PDCD4, MTSS1 und TUSC3 hin untersucht, mit klinisch-pathologischen Parametern korreliert und die Ergebnisse unter Berücksichtigung der Forschungsliteratur diskutiert.

Dabei wurde diese epigenetische Veränderung durch MethyQESD (Bettstetter et al., 2008), einer Methode, die eine Kombination aus methylierungssensitivem Verdau und *real-time* PCR darstellt, quantitativ detektiert. Eine Bisulfitkonversion der aus paraffineingebettetem Resektionsmaterial gewonnenen DNA war hierfür nicht notwendig.

Die Untersuchung ergab folgende Methylierungsmuster:

MGMT war in dieser Arbeit zu jeweils 7,1 Prozent der Tumoren (3/42) und Bronchialepithelien (2/28) und in 2,4 Prozent des nicht-malignen Lungengewebes (1/42) methyliert. Lediglich bei einem Patienten war diese Veränderung in zwei Gewebetypen, nämlich Lunge und Tumor, gleichzeitig zu finden. Ein Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Parametern ließ sich nicht herstellen. Damit bleiben die Methylierungsraten dieser Arbeit zu meist deutlich hinter den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen zurück, wobei dies durchaus auch auf die Verwendung unterschiedlicher Methoden zurückzuführen sein könnte.

Die bei RASSF1A im Tumor gefundene Methylierungshäufigkeit von 26,2 Prozent (11/41) ist mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen vereinbar. Bronchus war zu 3,4 Prozent (1/29) von dieser Veränderung betroffen, Lungengewebe hingegen überhaupt nicht (0/42), so dass ein deutlicher Unterschied zwischen benignem und malignem Gewebe vorliegt. Dabei war diese epigenetische Veränderung ausschließlich in einem der drei Gewebetypen zu finden. Auch bei RASSF1A ließ sich keine Korrelation mit klinisch-pathologischen Größen herstellen, so dass die Kenntnis über die Methylierung nicht zur Einschätzung der Prognose der Patienten geeignet scheint.

Bei RASAL1, PDCD4 und MTSS1 dürfte diese epigenetische Veränderung zu vernachlässigen sein, da die untersuchten Regionen letztgenannter Gene doch in keinem Gewebetyp methyliert waren. Lediglich RASAL1 zeigte mit 4,8 Prozent (2/42) im Tumor und 2,4 Prozent (1/42) in der Lunge vereinzelt eine Methylierung, wobei bei dem Patienten mit Methylierung in der Lungenbiopsie diese auch im Tumor zu finden war. Somit scheinen

den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge Methylierungen dieser drei Gene beim Bronchialkarzinom keine größere Rolle zu spielen. Gerade bei PDCD4 und MTSS1 könnten andere Regulationsmechanismen im Vordergrund stehen.

TUSC3 wies mit Abstand die höchsten Methylierungsraten auf. Bronchus war mit 67,9 (19/28), Lunge mit 31 (13/42) und Tumor mit 58,5 Prozent (25/42) von dieser Veränderung betroffen. Bei 16 Patienten war neben dem Tumor- gleichzeitig auch benignes Gewebe methyliert, in 11 Fällen allerdings ausschließlich Lunge und Bronchus. Interessanterweise lebten Patienten mit Methylierung im Tumorgewebe signifikant länger als solche ohne diese Modifikation, wobei dieses Ergebnis nicht unbedingt kausal bedingt sein muss. Außerdem war im Tumorgewebe der T-Stadien T1a, T1b und T2a signifikant häufiger eine Methylierung als in den Stadien T2b, T3 und T4 zu finden. Dieser Effekt trat jedoch nicht mehr auf, wenn auf die Unterteilung der T-Stadien in a und b verzichtet wurde. Zudem ließ sich zwischen der Stadienverteilung I bis IV und der Methylierung von TUSC3 im Bronchialepithel ein signifikanter Zusammenhang nachweisen, wobei dieser wiederum bei Unterteilung der Stadien in A und B nicht mehr beobachtet werden konnte. Zu anderen klinisch-pathologischen Parametern ließ sich keine signifikante Korrelation herstellen.

Eine simultane Methylierung von mehr als einem Gen konnte bei gleichzeitiger Betrachtung von Bronchus-, Lungen- und Tumorgewebe bei 12 Patienten festgestellt werden. Für Tumorgewebe allein war dies bei sechs Patienten der Fall, wobei fünfmal lediglich zwei und einmal drei Gene diese Modifikation aufwiesen. Daher erscheint es nicht gerechtfertigt, im hier untersuchten Patientengut bei ausschließlicher Betrachtung der sechs untersuchten Gene von der Existenz eines „CpG island methylator phenotype“ zu sprechen.

## 8      **Ausblick**

Ein ungelöstes Problem in der Medizin bleibt weiterhin die häufig zu späte Diagnose des mit großer Morbidität und hoher Mortalität einhergehenden Lungenkarzinoms. Symptome treten jedoch oft erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien auf. Gerade die frühzeitige Erkennung und Therapie dieses Krebsleidens sind jedoch häufig entscheidend für den Therapieerfolg und die Prognose des Patienten (Übersicht in: Adamietz et al., 2010).

Die Entstehung von Tumoren ist eng mit genetischen und epigenetischen Veränderungen in der Zelle verbunden, worunter auch Promotormethylierungen zu zählen sind (Übersicht in: Herbst et al., 2008). Die Kenntnis solcher Modifikationen könnte somit durchaus im Rahmen von Screeningprogrammen bei Risikopersonen zur Früherkennung von Lungentumoren beitragen, aber auch helfen, die Prognose und den Therapieerfolg vorherzusagen. Hierfür einen einzelnen Marker von ausreichender Sensitivität und Spezifität zu finden, dürfte allerdings schwierig sein. Ein Panel von Markern, das durchaus auch Gene mit Methylierung umfasst, könnte diese Kriterien jedoch erfüllen. Ein weiteres Ziel der Gewinnung von Informationen über molekulare Veränderungen besteht darin, diese zur Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten zu nutzen.

Wie bereits bei der Diskussion zu den einzelnen Genen angedeutet, ergeben sich aus den Ergebnissen dieser Dissertation sowie der Beschäftigung mit der Forschungsliteratur neue Fragestellungen und Aspekte, die im Folgenden nochmals zusammengefasst werden sollen:

(1) Aufgrund der niedrigen Methylierungshäufigkeit und dem fehlenden Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Parametern in dieser Arbeit scheint MGMT weder für diagnostische Zwecke noch für prognostische Aussagen relevant zu sein. Um der Diskrepanz zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die deutlich höhere Methylierungsraten nachwiesen, näher auf den Grund zu gehen, wäre es durchaus interessant, weitere Untersuchungen zu diesem Gen durchzuführen: Um eine bessere Repräsentativität zu erreichen, müssten einerseits eine deutlich größere Patientenzahl untersucht und, um ethnischen Aspekten gerecht zu werden, die Studienteilnehmer multizentrisch rekrutiert werden, während andererseits die im Diskussionsteil angesprochenen methodischen Aspekte Berücksichtigung finden sollten. Außerdem scheint die Methylierung von MGMT mit anderen genetischen Phänomenen wie der Mutation von p53 assoziiert zu sein (Wu et al., 2008). Auch der Aspekt der Allel-spezifischen Methylierung verdient weitere Beachtung (Leng et al., 2011). Aus der genaueren Untersuchung dieser und Entdeckung weiterer Zusammen-

hänge ließen sich unter Umständen kumulative Effekte genetischer und epigenetischer Veränderungen auf die Krebsentstehung ableiten, aber auch Erkenntnisse gewinnen, welche Personen für solche Modifikationen empfänglicher sind und damit ein erhöhtes Erkrankungsrisiko tragen. Des Weiteren wäre die von einigen Autoren (Xu et al., 2004; Pasini et al., 2012) aufgestellte Vermutung, die Methylierung von MGMT sei nicht automatisch gleichbedeutend mit einem Expressionsverlust, näher zu betrachten.

(2) RASSF1A hingegen war im Tumor durchaus von dieser epigenetischen Modifikation betroffen, jedoch kaum in nicht neoplastisch-alteriertem Gewebe. Aufgrund des fehlenden Zusammenhangs beider Gene mit klinisch-pathologischen Parametern dürfte deren Bedeutung im Rahmen der Prognoseeinschätzung der Patienten jedoch begrenzt sein. Nichtsdestotrotz ist es denkbar, dass dieses Gen in Kombination mit anderen Markern einen diagnostischen Nutzen erlangen und dazu beitragen wird, die Diagnosesicherheit eines Markerpanels zu erhöhen. Van der Drift et al., 2011 schlagen dies bereits für die gleichzeitige Analyse der Methylierung von RASSF1A und der Mutation von KRAS in der Bronchiallavage vor. In diesem Sinne wären weitere Untersuchungen wünschenswert.

(3) Methylierungen von RASAL1, PDCD4 und MTSS1 spielen beim Bronchialkarzinom wohl keine Rolle und eignen sich daher nicht als diagnostisches Tool. Allerdings sind die Erkenntnisse über die Funktion und Bedeutung dieser Gene beim Bronchialkarzinom bislang spärlich, so dass weitere Untersuchungen hierzu sowie die Erforschung alternativer Inaktivierungsmechanismen interessant sein dürften.

(4) Die Methylierung von TUSC3 im Tumor war erstaunlicherweise mit einem besseren Überleben der Patienten assoziiert. Bronchialepithel wies diese Veränderung zudem häufiger auf als das zugehörige maligne Gewebe, weshalb diese Ergebnisse nur schwer mit der allgemein postulierten Funktion von TUSC3 als Tumorsuppressorgen zu vereinbaren sind, zumal auch in der Forschungsliteratur hierzu kein eindeutiger Standpunkt zu finden ist. Außerdem ist die Repräsentativität dieser Arbeit aufgrund der relativ überschaubaren Zahl der eingeschlossenen Patienten begrenzt. Daher sind folgende Fragestellungen von Interesse: Welche Bedeutung kommt TUSC3 im Rahmen von Tumorerkrankungen generell und insbesondere im Fall des Bronchialkarzinoms zu? Handelt es sich bei der Promotormethylierung von TUSC3 um einen relevanten Inaktivierungsmechanismus? Welche Auswirkungen hat diese Modifikation auf die Expression dieses Gens sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene? Sind eventuell auch andere Promotorbereiche als der hier untersuchte für einen Expressionsverlust verantwortlich oder existieren sogar mehrere Promotoren, die alternativ verwendet werden? Besitzt TUSC3 tatsächlich eine tumorsupprimierende Funktion



und wenn ja, spielt sein Verlust vor allem in frühen, wie es den Ergebnissen dieser Arbeit nach den Anschein macht, oder doch eher in späten Stadien der Erkrankung eine Rolle? Führt der Expressionsverlust von TUSC3 tatsächlich zu einem Wachstumsvorteil und lässt sich dieser in vivo bestätigen? Kann bei gesunden Individuen aus der Methylierung von TUSC3 im Normalgewebe ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung am Bronchialkarzinom abgeleitet werden? Unter Umständen könnte dann auch die Analyse der Methylierung dieses Gens im Sputum zu diagnostischen Zwecken, insbesondere im Rahmen einer Früherkennung, herangezogen werden.

(5) Zwar war bei einigen Patienten dieser Arbeit mehr als ein Gen im Tumorgewebe methyliert, daraus Rückschlüsse auf einen „CpG island methylator phenotype“ zu ziehen, würde jedoch zu weit führen. Trotzdem scheint es lohnenswert, dieses Phänomen beim Bronchialkarzinom näher zu untersuchen, wobei MGMT, vor allem aber auch RASSF1A und TUSC3 als potentielle Kandidatengene zu berücksichtigen wären.

(6) Die Inaktivierung von Genen durch Methylierung steht zudem im Verdacht, die Wirkung von Medikamenten zur Therapie der Tumorerkrankung zu beeinflussen. Schon lange ist bekannt, dass Glioblastompatienten mit Methylierung von MGMT von einer Behandlung mit der alkylierenden Substanz Temozolomid profitieren (Hegi et al., 2005). Ingold et al., 2009 wiesen in Hirnmetastasen von Lungenkarzinompatienten diese Veränderung nach, allerdings verwendeten sie eine nested-PCR. Einigen Beobachtungen am zerebralmetastasierten Bronchialkarzinom zufolge scheint eine Therapie mit Temozolomid in Kombination mit anderen Chemotherapeutika vertretbar (Ebert et al., 2003; Lukas et al., 2012). Andere Studien zu diesem Medikament in Kombination mit Radiatio liefern weniger aussagekräftige Ergebnisse (Verger et al., 2005; Hassler et al., 2013). Fraipont et al. beobachteten in ihrer Arbeit von 2012, dass Lungenkarzinompatienten mit Methylierung von RASSF1A ein längeres krankheitsfreies Überleben aufwiesen, wenn sie eine neoadjuvante Chemotherapie mit Carboplatin-Paclitaxel anstelle von Gemcitabin-Cisplatin erhielten. Auch die Behandlung mit hypomethylierenden Substanzen wie Decitabin, wenn auch bislang wenig erfolgreich, wird immer wieder diskutiert (Übersicht in: Liu, S. et al., 2013). Folglich könnten weitere Erkenntnisse zu solchen Wechselbeziehungen und Wirkmechanismen dazu beitragen, spezifischere Therapien zu entwickeln und dadurch den Patienten unnötige und belastende Behandlungen zu ersparen und deren Outcome zu verbessern.

## 9 Anhang

---

### TNM-Klassifikation der Lungenkarzinome (UICC, 7.Auflage, 2010)

---

#### T – Primärtumor

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden oder positive Zytologie
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	≤ 3 cm
T1a	≤ 2 cm
T1b	> 2-3 cm
T2	Hauptbronchus ≥ 2 cm von der Carina, Invasion von viszeraler Pleura, partielle Atelektase
T2a	> 3-5 cm
T2b	> 5-7 cm
T3	> 7 cm, Brustwand, Zwerchfell, Perikard, mediastinale Pleura, Hauptbronchus < 2 cm von der Carina, totale Atelektase, separate(r) Tumorherd(e) im selben Lappen
T4	Mediastinum, Herz, große Gefäße, Carina, Trachea, Ösophagus, Wirbelkörper, separate(r) Tumorherd(e) in einem ipsilateralen anderen Lappen

---

#### N - regionäre Lymphknoten <sup>1)</sup>

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Ipsilaterale peribronchiale/hiläre Lymphknoten
N2	Ipsilaterale mediastinale/subkarinale Lymphknoten
N3	Kontralaterale mediastinale, hiläre, ipsi- oder kontralaterale Skalenus- oder supraklavikuläre Lymphknoten

---

#### M - Fernmetastasen

M0	Keine Fernmetastasen
M1	Metastasen
M1a	Separate(r) Tumorherd(e) in einem kontralateralen Lappen, Pleurametastasen, maligner Pleura- oder Perikarderguss
M1b	Fernmetastasen

---

- 1) Die regionären Lymphknoten umfassen die thorakalen (mediastinalen, hilären, lobären, segmentalen und subsegmentalen), Skalenus- und supraklavikulären Lymphknoten.

**Tabelle 9.1**      **TNM-Klassifikation der Karzinome der Lunge: aus Wittekind, C.; Meyer, H.-J.; „TNM-Klassifikation maligner Tumoren“, 7. Auflage; Wiley-Blackwell, Weinheim, 2010.**

---

**Histopathologisches Grading von Lungenkarzinomen**


---

GX	Differenzierungsgrad kann nicht beurteilt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

---

**Tabelle 9.2**      **Histopathologisches Grading: aus Wittekind, C.; Meyer, H.-J.; „TNM-Klassifikation maligner Tumoren“, 7. Auflage; Wiley-Blackwell, Weinheim, 2010.**

---

**Stadiengruppierung beim Lungenkarzinom (UICC, 7. Auflage, 2010)**


---

<b>Stadium</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
Okkultes Karzinom	TX	N0	M0
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I			
Stadium IA	T1a, T1b	N0	M0
Stadium IB	T2a	N0	M0
Stadium II			
Stadium IIA	T2b	N0	M0
	T1a, T1b, T2a	N1	M0
Stadium IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium III			
Stadium IIIA	T1a, T1b, T2a, T2b	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
Stadium IIIB	T4	N2	M0
	Jedes T	N3	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

---

**Tabelle 9.3**      **Stadiengruppierung: aus Wittekind, C.; Meyer, H.-J.; „TNM-Klassifikation maligner Tumoren“, 7. Auflage; Wiley-Blackwell, Weinheim, 2010.**

	Gewebetyp		
	Bronchus	Lunge	Tumor
	%	%	%
<b>MGMT</b>			
Pat.Nr. 13	-	1	<b>58</b>
Pat.Nr. 28	<b>7</b>	0	3
Pat.Nr. 34	-	<b>54</b>	<b>14</b>
Pat.Nr. 36	2	0	<b>131</b>
Pat.Nr. 39	<b>5</b>	1	2

**Tabelle 9.4**      **Relative Methylierungsstärke in Prozent von MGMT in Bronchus, Lunge und Tumor bei Patienten mit positivem Methylierungsstatus**

	Gewebetyp		
	Bronchus	Lunge	Tumor
	%	%	%
<b>RASSF1A</b>			
Pat.Nr. 3	-	3	<b>7</b>
Pat.Nr. 5	0	1	<b>44</b>
Pat.Nr. 7	0	0	<b>91</b>
Pat.Nr. 8	0	0	<b>43</b>
Pat.Nr. 11	-	0	<b>7</b>
Pat.Nr. 12	4	0	<b>10</b>
Pat.Nr. 16	0	0	<b>5</b>
Pat.Nr. 23	0	0	<b>28</b>
Pat.Nr. 27	0	0,5	<b>10</b>
Pat.Nr. 28	<b>7</b>	0	2
Pat.Nr. 36	0	0	<b>58</b>
Pat.Nr. 38	0	0	<b>8</b>

**Tabelle 9.5**      **Relative Methylierungsstärke in Prozent von RASSF1A in Bronchus, Lunge und Tumor bei Patienten mit positivem Methylierungsstatus**

	<b>Gewebetyp</b>		
	Bronchus	Lunge	Tumor
	%	%	%
<b>RASAL1</b>			
Pat.Nr. 26	1	0	<b>16</b>
Pat.Nr. 34	-	<b>34,5</b>	<b>6,5</b>

**Tabelle 9.6**      **Relative Methylierungsstärke in Prozent von RASAL1 in Bronchus, Lunge und Tumor bei Patienten mit positivem Methylierungsstatus**

	<b>Gewebetyp</b>		
	Bronchus	Lunge	Tumor
	%	%	%
<b>TUSC3</b>			
Pat.Nr. 1	<b>10</b>	4	<b>10</b>
Pat.Nr. 2	<b>12</b>	4	<b>5</b>
Pat.Nr. 4	-	2	<b>19</b>
Pat.Nr. 6	3	2	<b>13</b>
Pat.Nr. 9	<b>9</b>	3	<b>5</b>
Pat.Nr. 10	<b>5</b>	2	<b>5</b>
Pat.Nr. 11	-	<b>5</b>	<b>53</b>
Pat.Nr. 12	4	3	<b>9</b>
Pat.Nr. 13	-	<b>8</b>	3
Pat.Nr. 14	-	3	<b>6</b>
Pat.Nr. 15	-	<b>6</b>	4
Pat.Nr. 16	4	<b>5</b>	1
Pat.Nr. 17	-	<b>9</b>	<b>12</b>
Pat.Nr. 18	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>12</b>
Pat.Nr. 19	<b>6</b>	4	3
Pat.Nr. 21	<b>8</b>	1	4
Pat.Nr. 22	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>8</b>
Pat.Nr. 23	-	4	<b>10</b>
Pat.Nr. 24	<b>6</b>	4	<b>21</b>
Pat.Nr. 25	-	4	<b>12</b>
Pat.Nr. 26	<b>7</b>	4	3

	Gewebetyp		
	Bronchus	Lunge	Tumor
	%	%	%
Pat.Nr. 27	<b>7,5</b>	<b>5</b>	<b>8</b>
Pat.Nr. 28	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>11</b>
Pat.Nr. 29	-	0	<b>6</b>
Pat.Nr. 30	4	3	<b>5</b>
Pat.Nr. 31	<b>15</b>	1	<b>21</b>
Pat.Nr. 32	-	4	<b>11</b>
Pat.Nr. 33	3	<b>5</b>	4
Pat.Nr. 34	-	<b>71</b>	<b>24</b>
Pat.Nr. 35	<b>5</b>	<b>15</b>	<b>13</b>
Pat.Nr. 36	<b>9</b>	4	1
Pat.Nr. 37	<b>7</b>	3	<b>8</b>
Pat.Nr. 38	<b>8</b>	4	1
Pat.Nr. 39	<b>6</b>	2	<b>9</b>
Pat.Nr.41	3	<b>4,5</b>	2
Pat.Nr. 42	<b>8</b>	3	1

**Tabelle 9.7**      **Relative Methylierungsstärke in Prozent von TUSC3 in Bronchus, Lunge und Tumor bei Patienten mit positivem Methylierungsstatus**

		Gewebetyp		
		Bronchus	Lunge	Tumor
		%	%	%
Pat.Nr. 11	RASSF1A	-	0	<b>7</b>
	TUSC3	-	<b>5</b>	<b>53</b>
Pat.Nr. 12	RASSF1A	4	0	<b>10</b>
	TUSC3	4	3	<b>9</b>
Pat.Nr. 13	MGMT	-	1	<b>58</b>
	TUSC3	-	<b>8</b>	3
Pat.Nr. 16	RASSF1A	0	0	<b>5</b>
	TUSC3	4	<b>5</b>	1
Pat.Nr. 23	RASSF1A	0	0	<b>28</b>
	TUSC3	-	-	<b>10</b>
Pat.Nr. 26	RASAL1	1	0	<b>16</b>
	TUSC3	<b>7</b>	4	3

		Gewebetyp		
		Bronchus	Lunge	Tumor
	Gen	%	%	%
Pat.Nr. 27	RASSF1A	0	0,5	10
	TUSC3	7,5	5	8
	MGMT	7	0	3
Pat.Nr. 28	RASSF1A	7	0	2
	TUSC3	8	9	11
	MGMT	-	55	14
Pat.Nr. 34	RASAL1	-	34,5	6,5
	TUSC3	-	71	24
	MGMT	2	0	131
Pat.Nr. 36	RASSF1A	0	0	58
	TUSC3	9	4	1
Pat.Nr. 38	RASSF1A	0	0	8
	TUSC3	8	4	1
Pat.Nr. 39	MGMT	5	1	2
	TUSC3	6	2	9

**Tabelle 9.8**      **Relative Methylierungsstärke in Prozent bei Patienten mit positivem Methylierungsstatus mehrerer Gene**

## 10 Literaturverzeichnis

- Adamietz IA, Niederle N. Lungenkarzinom [Non-small cell lung cancer]. *Onkologe*. 2010;16(6):615–28. German.
- Affara M, Sanders D, Araki H, Tamada Y, Dunmore BJ, Humphreys S, Imoto S, Savoie C, Miyano S, Kuhara S, Jeffries D, Print C, Charnock-Jones DS. Vasohibin-1 is identified as a master-regulator of endothelial cell apoptosis using gene network analysis. *BMC Genomics*. 2013;14:23.
- Afonja O, Juste D, Das S, Matsushashi S, Samuels HH. Induction of PDCD4 tumor suppressor gene expression by RAR agonists, antiestrogen and HER-2/neu antagonist in breast cancer cells. Evidence for a role in apoptosis. *Oncogene*. 2004;23(49):8135–45.
- Agathangelou A, Bièche I, Ahmed-Choudhury J, Nicke B, Dammann R, Baksh S, Gao B, Minna JD, Downward J, Maher ER, Latif F. Identification of novel gene expression targets for the Ras association domain family 1 (RASSF1A) tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer and neuroblastoma. *Cancer Res*. 2003;63(17):5344–51.
- Agathangelou A, Cooper WN, Latif F. Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res*. 2005;65(9):3497–508.
- Agathangelou A, Honorio S, Macartney DP, Martinez A, Dallol A, Rader J, Fullwood P, Chauhan A, Walker R, Shaw JA, Hosoe S, Lerman MI, Minna JD, Maher ER, Latif F. Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene*. 2001;20(12):1509–18.
- Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JPI. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res*. 1998;58(23):5489–94.
- Ali AHK, Kondo K, Namura T, Senba Y, Takizawa H, Nakagawa Y, Toba H, Kenzaki K, Sakiyama S, Tangoku A. Aberrant DNA methylation of some tumor suppressor genes in lung cancers from workers with chromate exposure. *Mol Carcinog*. 2011;50(2):89–99.
- Allen M, Chu S, Brill S, Stotler C, Buckler A. Restricted tissue expression pattern of a novel human rasGAP-related gene and its murine ortholog. *Gene*. 1998;218(1-2):17–25.
- Alonso A, Julià A, Tortosa R, Canaleta C, Cañete JD, Ballina J, Balsa A, Tornero J, Marsal S. CNstream: a method for the identification and genotyping of copy number polymorphisms using Illumina microarrays. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:264.
- Alonso Guervós M, Álvarez Marcos C, Hermsen M, Sampedro Nuño A, Suárez C, Llorente JL. Deletions of N33, STK11 and TP53 are involved in the development of lymph node metastasis in larynx and pharynx carcinomas. *Cell Oncol*. 2007;29(4):327–34.
- Alonso Guervós M, Álvarez Marcos C, Llorente JL, Sampedro Nuño A, Suárez C, Hermsen M. Genetic differences between primary larynx and pharynx carcinomas and their matched lymph node metastases by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Oral Oncol*. 2009;45(7):600–4.
- Álvarez Marcos C, Alonso Guervós M, Rodríguez Prado N, Sampedro Gimeno T, Domínguez Iglesias F, Hermsen M, Llorente JL. Genetic model of transformation and neoplastic progression in laryngeal epithelium. *Head Neck*. 2010;33(2):216–24.
- Andersen CL, Wiuf C, Kruhøffer M, Korsgaard M, Laurberg S, Ørntoft TF. Frequent occurrence of uniparental disomy in colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2007;28(1):38–48.
- Arasradnam RP, Khoo K, Bradburn M, Mathers JC, Kelly SB. DNA methylation of ESR-1 and N-33 in colorectal mucosa of patients with ulcerative colitis (UC). *Epigenetics*. 2010;5(5):422–6.
- Asangani IA, Rasheed SAK, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcdcd4 and



- stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*. 2008;27(15):2128–36.
- Auerbach O, Garfinkel L. The changing pattern of lung carcinoma. *Cancer*. 1991;68(9):1973–7.
- Bachman KE, Park BH. Dual nature of TGF- $\beta$  signaling: tumor suppressor vs. tumor promoter. *Curr Opin Oncol*. 2005;17(1):49–54.
- Bae SI, Lee HS, Kim SH, Kim WH. Inactivation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter CpG island hypermethylation in gastric cancers. *Br J Cancer*. 2002;86(12):1888–92.
- Baksh S, Tommasi S, Fenton S, Yu VC, Martins LM, Pfeifer GP, Latif F, Downward J, Neel BG. The tumor suppressor RASSF1A and MAP-1 link death receptor signaling to Bax conformational change and cell death. *Mol Cell*. 2005;18(6):637–50.
- Bashyam MD, Bair R, Kim YH, Wang P, Hernandez-Boussard T, Karikari CA, Tibshirani R, Maitra A, Pollack JR. Array-based comparative genomic hybridization identifies localized DNA amplifications and homozygous deletions in pancreatic cancer. *Neoplasia*. 2005;7(6):556–62.
- Bean J, Riely GJ, Balak M, Marks JL, Ladanyi M, Miller VA, Pao W. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors associated with a novel T854A mutation in a patient with EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(22):7519–25.
- Bechtel W, McGoochan S, Zeisberg EM, Müller GA, Kalbacher H, Salant DJ, Müller CA, Kalluri R, Zeisberg M. Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med*. 2010;16(5):544–50.
- Begum S, Brait M, Dasgupta S, Ostrow KL, Zahurak M, Carvalho AL, Califano JA, Goodman SN, Westra WH, Hoque MO, Sidransky D. An epigenetic marker panel for detection of lung cancer using cell-free serum DNA. *Clin Cancer Res*. 2011;17(13):4494–503.
- Bekhouche I, Finetti P, Adelaïde J, Ferrari A, Tarpin C, Charafe-Jauffret E, Charpin C, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Bidaut G, Birnbaum D, Viens P, Chaffanet M, Bertucci F, Falciiani F. High-resolution comparative genomic hybridization of inflammatory breast cancer and identification of candidate genes. *PLoS ONE*. 2011;6(2):e16950.
- Belinsky SA, Klinge DM, Dekker JD, Smith MW, Bocklage TJ, Gilliland FD, Crowell RE, Karp DD, Stidley CA, Picchi MA. Gene promoter methylation in plasma and sputum increases with lung cancer risk. *Clin Cancer Res*. 2005;11(18):6505–11.
- Belinsky SA, Liechty KC, Gentry FD, Wolf HJ, Rogers J, Vu K, Haney J, Kennedy TC, Hirsch FR, Miller Y, Franklin WA, Herman JG, Baylin SB, Bunn PA, Byers T. Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort. *Cancer Res*. 2006;66(6):3338–44.
- Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(20):11891–6.
- Belshaw NJ, Elliott GO, Foxall RJ, Dainty JR, Pal N, Coupe A, Garg D, Bradburn DM, Mathers JC, Johnson IT. Profiling CpG island field methylation in both morphologically normal and neoplastic human colonic mucosa. *Br J Cancer*. 2008;99(1):136–42.
- Bergethon K, Shaw AT, Ou SHI, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, Massion PP, Siwak-Tapp C, Gonzalez A, Fang R, Mark EJ, Batten JM, Chen H, Wilner KD, Kwak EL, Clark JW, Carbone DP, Ji H, Engelman JA, Mino-Kenudson M, Pao W, Iafrate AJ. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol*. 2012;30(8):863–70.
- Bershteyn M, Atwood SX, Woo W, Li M, Oro AE. MIM and cortactin antagonism regulates ciliogenesis and hedgehog signaling. *Dev Cell*. 2010;19(2):270–83.
- Bettstetter M, Dechant S, Ruemmele P, Vogel C, Kurz K, Morak M, Keller G, Holinski-Feder E, Hofstaedter F, Dietmaier W. MethyQESD, a robust and fast method for quantitative methylation

- analyses in HNPCC diagnostics using formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples. *Lab Invest.* 2008;88(12):1367–75.
- Bierie B, Moses HL. Tumour microenvironment: TGF $\beta$ : the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2006;6(7):506–20.
- Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression – belts, braces, and chromatin. *Cell.* 1999;99(5):451–4.
- Birnbaum DJ, Adélaïde J, Mamessier E, Finetti P, Lagarde A, Monges G, Viret F, Gonçalves A, Turrini O, Delpero JR, Iovanna J, Giovannini M, Birnbaum D, Chaffanet M. Genome profiling of pancreatic adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2011;50(6):456–65.
- Bitomsky N, Böhm M, Klempnauer KH. Transformation suppressor protein Pdc4 interferes with JNK-mediated phosphorylation of c-Jun and recruitment of the coactivator p300 by c-Jun. *Oncogene.* 2004;23(45):7484–93.
- Bitomsky N, Wethkamp N, Marikkannu R, Klempnauer KH. siRNA-mediated knockdown of Pdc4 expression causes upregulation of p21(Waf1/Cip1) expression. *Oncogene.* 2008;27(35):4820–9.
- Bogden JM, Eastman A, Bresnick E. A system in mouse liver for the repair of O6-methylguanine lesions in methylated DNA. *Nucleic Acids Res.* 1981;9(13):3089–103.
- Bompard G, Sharp SJ, Freiss G, Machesky LM. Involvement of Rac in actin cytoskeleton rearrangements induced by MIM-B. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 22):5393–403.
- Bova GS, Carter BS, Bussemakers MJG, Emi M, Fujiwara Y, Kyprianou N, Jacobs SC, Robinson JC, Epstein JI, Walsh PC, Isaacs WB. Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. *Cancer Res.* 1993;53(17):3869–73.
- Bova GS, MacGrogan D, Levy A, Pin SS, Bookstein R, Isaacs WB. Physical mapping of chromosome 8p22 markers and their homozygous deletion in a metastatic prostate cancer. *Genomics.* 1996;35(1):46–54.
- Brabender J, Usadel H, Metzger R, Schneider PM, Park J, Salonga D, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lord RV, Takebe N, Schneider S, Hölscher AH, Danenberg KD, Danenberg PV. Quantitative O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase methylation analysis in curatively resected non-small cell lung cancer: associations with clinical outcome. *Clin Cancer Res.* 2003;9(1):223–7.
- Bradley WEC, Raelson JV, Dubois DY, Godin E, Fournier H, Privé C, Allard R, Pinchuk V, Lapalme M, Paulussen RJA, Belouchi A. Hotspots of large rare deletions in the human genome. *PLoS ONE.* 2010;5(2):e9401.
- Brandes JC, Carraway H, Herman JG. Optimal primer design using the novel primer design program: MSPprimer provides accurate methylation analysis of the ATM promoter. *Oncogene.* 2007;26(42):6229–37.
- Bugge MD, Kjærheim K, Førelund S, Eduard W, Kjuus H. Lung cancer incidence among Norwegian silicon carbide industry workers: associations with particulate exposure factors. *Occup Environ Med.* 2012;69(8):527–33.
- Burbee DG, Forgacs E, Zöchbauer-Müller S, Shivakumar L, Fong K, Gao B, Randle D, Kondo M, Virmani A, Bader S, Sekido Y, Latif F, Milchgrub S, Toyooka S, Gazdar AF, Lerman MI, Zabarovsky E, White M, Minna JD. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(9):691–9.
- Buttitta F, Barassi F, Fresu G, Felicioni L, Chella A, Paolizzi D, Lattanzio G, Salvatore S, Campese PP, Rosini S, Iarussi T, Mucilli F, Mezzetti A, Sacco R, Marchetti A. Mutational analysis of the HER2 gene in lung tumors from Caucasian patients: Mutations are mainly present in adenocarcinomas with bronchioloalveolar features. *Int J Cancer.* 2006;119(11):2586–91.

- Byun DS, Lee MG, Chae KS, Ryu BG, Chi SG. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A by aberrant promoter hypermethylation in human gastric adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2001;61(19):7034–8.
- Callahan CA, Ofstad T, Horng L, Wang JK, Zhen HH, Coulombe PA, Oro AE. MIM/BEG4, a Sonic hedgehog-responsive gene that potentiates Gli-dependent transcription. *Genes Dev.* 2004;18(22):2724–9.
- Calvisi DF, Ladu S, Conner EA, Seo D, Hsieh JT, Factor VM, Thorgeirsson SS. Inactivation of Ras GTPase-activating proteins promotes unrestrained activity of wild-type Ras in human liver cancer. *J Hepatol.* 2011;54(2):311–9.
- Cao M, Zhan T, Ji M, Zhan X. Dimerization is necessary for MIM-mediated membrane deformation and endocytosis. *Biochem J.* 2012;446(3):469–75.
- Cao Z, Yoon JH, Nam SW, Lee JY, Park WS. PDCD4 expression inversely correlated with miR-21 levels in gastric cancers. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012;138(4):611–9.
- Casey TM, Eneman J, Crocker A, White J, Tessitore J, Stanley M, Harlow S, Bunn JY, Weaver D, Muss H, Plaut K. Cancer associated fibroblasts stimulated by transforming growth factor beta1 (TGF- $\beta$ 1) increase invasion rate of tumor cells: a population study. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;110(1):39–49.
- Castaño-Milla C, Chaparro M, Gisbert JP. Systematic review with meta-analysis: the declining risk of colorectal cancer in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39(7):645–59.
- Castro M, Grau L, Puerta P, Gimenez L, Venditti J, Quadrelli S, Sánchez-Carbayo M. Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes and clinical outcome in lung cancer. *J Transl Med.* 2010;8:86.
- Chen H, Yang XW, Zhang H, Yang Q, Wang Z, Liu Y, Lu FL, Zhou BY, Qiu-Xi CH, Lu SL. In vivo and in vitro expression of the RASAL1 gene in human gastric adenocarcinoma and its clinicopathological significance. *Oncol Lett.* 2012;3(3):535–40.
- Chen Q, Chen L, Zhao R, Yang XD, Imran K, Xing CG. Microarray analyses reveal liver metastasis-related genes in metastatic colorectal cancer cell model. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013;139(7):1169–78.
- Chen Y, Liu W, Chao T, Zhang Y, Yan X, Gong Y, Qiang B, Yuan J, Sun M, Peng X. MicroRNA-21 down-regulates the expression of tumor suppressor PDCD4 in human glioblastoma cell T98G. *Cancer Lett.* 2008;272(2):197–205.
- Chen Y, Knösel T, Kristiansen G, Pietas A, Garber ME, Matsushashi S, Ozaki I, Petersen I. Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumour progression and prognosis. *J Pathol.* 2003;200(5):640–6.
- Cheng YW, Chiou HL, Sheu GT, Hsieh LL, Chen JT, Chen CY, Su JM, Lee H. The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. *Cancer Res.* 2001;61(7):2799–803.
- Cheung KF, Lam CNY, Wu K, Ng EKO, Chong WWS, Cheng ASL, To KF, Fan D, Sung JJY, Yu J. Characterization of the gene structure, functional significance, and clinical application of RNF180, a novel gene in gastric cancer. *Cancer.* 2012;118(4):947–59.
- Choi N, Son DS, Song I, Lee HS, Lim YS, Song MS, Lim DS, Lee J, Kim H, Kim J. RASSF1A is not appropriate as an early detection marker or a prognostic marker for non-small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2005;115(4):575–81.
- Chung KW, Kim SW, Kim SW. Gene expression profiling of papillary thyroid carcinomas in Korean patients by oligonucleotide microarrays. *J Korean Surg Soc.* 2012;82(5):271–80.
- Cirincione R, Lintas C, Conte D, Mariani L, Roz L, Vignola AM, Pastorino U, Sozzi G. Methylation profile in tumor and sputum samples of lung cancer patients detected by spiral computed tomography: a nested case-control study. *Int J Cancer.* 2006;118(5):1248–53.

- Cmarik JL, Min H, Hegamyer G, Zhan S, Kulesz-Martin M, Yoshinaga H, Matsushashi S, Colburn NH. Differentially expressed protein Pdcd4 inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(24):14037–42.
- Cooke SL, Pole JCM, Chin SF, Ellis IO, Caldas C, Edwards PAW. High-resolution array CGH clarifies events occurring on 8p in carcinogenesis. *BMC Cancer*. 2008;8:288.
- Costello JF, Frühwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomäki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Su Huang H, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA, Caveness WK, Plass C. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet*. 2000;24(2):132–8.
- Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W. Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature*. 1978;274(5673):775–80.
- Cunningham JM, Shan A, Wick MJ, McDonnell SK, Schaid DJ, Tester DJ, Qian J, Takahashi S, Jenkins RB, Bostwick DG, Thibodeau SN. Allelic imbalance and microsatellite instability in prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1996;56(19):4475–82.
- Dallol A, Agathangelou A, Fenton SL, Ahmed-Choudhury J, Hesson L, Vos MD, Clark GJ, Downward J, Maher ER, Latif F. RASSF1A interacts with microtubule-associated proteins and modulates microtubule dynamics. *Cancer Res*. 2004;64(12):4112–6.
- Dallol A, Agathangelou A, Tommasi S, Pfeifer GP, Maher ER, Latif F. Involvement of the RASSF1A tumor suppressor gene in controlling cell migration. *Cancer Res*. 2005;65(17):7653–9.
- Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet*. 2000;25(3):315–9.
- Dammann R, Schagdarsurengin U, Liu L, Otto N, Gimm O, Dralle H, Boehm BO, Pfeifer GP, Hoang-Vu C. Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene*. 2003;22(24):3806–12.
- Dammann R, Takahashi T, Pfeifer GP. The CpG island of the novel tumor suppressor gene RASSF1A is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas. *Oncogene*. 2001;20(27):3563–7.
- Danam RP, Howell SR, Brent TP, Harris LC. Epigenetic regulation of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression by histone acetylation and methyl-CpG binding proteins. *Mol Cancer Ther*. 2005;4(1):61–9.
- Danam RP, Qian XC, Howell SR, Brent TP. Methylation of selected CpGs in the human O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase promoter region as a marker of gene silencing. *Mol Carcinog*. 1999;24(2):85–9.
- Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, Deo H, Falk R, Forastiere F, Hakama M, Heid I, Kreienbrock L, Kreuzer M, Lagarde F, Mäkeläinen I, Muirhead C, Oberaigner W, Pershagen G, Ruano-Ravina A, Ruosteenoja E, Schaffrath Rosario A, Tirmarche M, Tomásek L, Whitley E, Wichmann HE, Doll R. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ*. 2005;330(7485):223.
- Dawson JC, Bruche S, Spence HJ, Braga VMM, Machesky LM. Mtss1 promotes cell-cell junction assembly and stability through the small GTPase Rac1. *PLoS ONE*. 2012b;7(3):e31141.
- Dawson JC, Timpson P, Kalna G, Machesky LM. Mtss1 regulates epidermal growth factor signaling in head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene*. 2012a;31(14):1781–93.
- de Fraipont F, Levallet G, Creveuil C, Bergot E, Beau-Faller M, Mounawar M, Richard N, Antoine M, Rouquette I, Favrot MC, Debieuvre D, Braun D, Westeel V, Quoix E, Brambilla E, Hainaut

- P, Moro-Sibilot D, Morin F, Milleron B, Zalcman G. An apoptosis methylation prognostic signature for early lung cancer in the IFCT-0002 trial. *Clin Cancer Res.* 2012;18(10):2976–86.
- de Jong WK, Verpooten GF, Kramer H, Louwagie J, Groen HJM. Promoter methylation primarily occurs in tumor cells of patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2009;29(1):363–9.
- De Matteis S, Consonni D, Lubin JH, Tucker M, Peters S, Vermeulen RC, Kromhout H, Bertazzi PA, Caporaso NE, Pesatori AC, Wacholder S, Landi MT. Impact of occupational carcinogens on lung cancer risk in a general population. *Int J Epidemiol.* 2012;41(3):711–21.
- Deng G, Peng E, Gum J, Terdiman J, Sleisenger M, Kim YS. Methylation of hMLH1 promoter correlates with the gene silencing with a region-specific manner in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2002;86(4):574–9.
- Deubler DA, Williams BJ, Zhu XL, Steele MR, Rohr LR, Jensen JC, Stephenson RA, Changus JE, Miller GJ, Becich MJ, Brothman AR. Allelic loss detected on chromosomes 8, 10, and 17 by fluorescence in situ hybridization using single-copy P1 probes on isolated nuclei from paraffin-embedded prostate tumors. *Am J Pathol.* 1997;150(3):841–50.
- Ding L, Zhang X, Zhao M, Qu Z, Huang S, Dong M, Gao F. An essential role of PDCD4 in progression and malignant proliferation of gastrointestinal stromal tumors. *Med Oncol.* 2012;29(3):1758–64.
- Doll R. Mortality from lung cancer in asbestos workers. *Br J Ind Med.* 1955;12(2):81–6.
- Dong SM, Sun DI, Benoit NE, Kuzmin I, Lerman MI, Sidransky D. Epigenetic inactivation of RASSF1A in head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 2003;9(10 Pt 1):3635–40.
- Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M. S6K1- and TRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science.* 2006;314(5798):467–71.
- Dreijerink K, Braga E, Kuzmin I, Geil L, Duh FM, Angeloni D, Zbar B, Lerman MI, Stanbridge EJ, Minna JD, Protopopov A, Li J, Kashuba V, Klein G, Zbarovsky ER. The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(13):7504–9.
- Du P, Ye L, Li H, Yang Y, Jiang WG. The tumour suppressive role of metastasis suppressor-1, MTSS1, in human kidney cancer, a possible connection with the SHH pathway. *J Exp Ther Oncol.* 2012;10(2):91–9.
- Du P, Ye L, Ruge F, Yang Y, Jiang WG. Metastasis suppressor-1, MTSS1, acts as a putative tumour suppressor in human bladder cancer. *Anticancer Res.* 2011;31(10):3205–12.
- Eads CA, Lord RV, Kurumboor SK, Wickramasinghe K, Skinner ML, Long TI, Peters JH, DeMeester TR, Danenberg KD, Danenberg PV, Laird PW, Skinner KA. Fields of aberrant CpG island hypermethylation in Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2000;60(18):5021–6.
- Ebert BL, Niemierko E, Shaffer K, Salgia R. Use of temozolomide with other cytotoxic chemotherapy in the treatment of patients with recurrent brain metastases from lung cancer. *Oncologist.* 2003;8(1):69–75.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 2004;429(6990):457–63.
- Emi M, Fujiwara Y, Nakajima T, Tsuchiya E, Tsuda H, Hirohashi S, Maeda Y, Tsuruta K, Miyaki M, Nakamura Y. Frequent loss of heterozygosity for loci on chromosome 8p in hepatocellular carcinoma, colorectal cancer, and lung cancer. *Cancer Res.* 1992;52(19):5368–72.
- Endoh H, Yatabe Y, Shimizu S, Tajima K, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T. RASSF1A gene inactivation in non-small cell lung cancer and its clinical implication. *Int J Cancer.* 2003;106(1):45–51.

- Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* 1999b;59(4):793–7.
- Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res.* 1999a;59(1):67–70.
- Fan H, Chen L, Zhang F, Quan Y, Su X, Qiu X, Zhao Z, Kong KL, Dong S, Song Y, Chan THM, Guan XY. MTSS1, a novel target of DNA methyltransferase 3B, functions as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 2012;31(18):2298–308.
- Fan H, Zhao Z, Quan Y, Xu J, Zhang J, Xie W. DNA methyltransferase 1 knockdown induces silenced CDH1 gene reexpression by demethylation of methylated CpG in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2007;19(11):952–61.
- Fassan M, Cagol M, Pennelli G, Rizzetto C, Giacomelli L, Battaglia G, Zaninotto G, Ancona E, Ruol A, Rugge M. Programmed cell death 4 protein in esophageal cancer. *Oncol Rep.* 2010;24(1):135–9.
- Feng Q, Hawes SE, Stern JE, Wiens L, Lu H, Dong ZM, Jordan CD, Kiviat NB, Vesselle H. DNA methylation in tumor and matched normal tissues from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(3):645–54.
- Fenton SL, Dallol A, Agathangelou A, Hesson L, Ahmed-Choudhury J, Baksh S, Sardet C, Dammann R, Minna JD, Downward J, Maher ER, Latif F. Identification of the E1A-regulated transcription factor p120 E4F as an interacting partner of the RASSF1A candidate tumor suppressor gene. *Cancer Res.* 2004;64(1):102–7.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx), accessed on 08/04/2014.
- Fetrow JS, Siew N, Di Gennaro JA, Martinez-Yamout M, Dyson HJ, Skolnick J. Genomic-scale comparison of sequence- and structure-based methods of function prediction: does structure provide additional insight? *Protein Sci.* 2001;10(5):1005–14.
- Foley CJ, Freedman H, Choo SL, Onyskiw C, Fu NY, Yu VC, Tuszyński J, Pratt JC, Baksh S. Dynamics of RASSF1A/MOAP-1 association with death receptors. *Mol Cell Biol.* 2008;28(14):4520–35.
- Franco Gutiérrez V, Álvarez Marcos C, Llorente JL, Alonso Guervós M, Domínguez Iglesias F, Argüelles Tamargo L, Hermesen M. Genetic profile of second primary tumors and recurrences in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck.* 2012;34(6):830–9.
- Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2008;283(2):1026–33.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89(5):1827–31.
- Fujiwara Y, Emi M, Ohata H, Kato Y, Nakajima T, Mori T, Nakamura Y. Evidence for the presence of two tumor suppressor genes on chromosome 8p for colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 1993;53(5):1172–4.
- Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, Nishii K, Matsuo K, Hotta K, Kozuki T, Aoe M, Kiura K, Ueoka H, Tanimoto M. Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(3):1219–25.

- Gao F, Wang X, Zhu F, Wang Q, Zhang X, Guo C, Zhou C, Ma C, Sun W, Zhang Y, Chen YH, Zhang L. PDCD4 gene silencing in gliomas is associated with 5'CpG island methylation and unfavourable prognosis. *J Cell Mol Med*. 2009;13(10):4257–67.
- Gao F, Zhang P, Zhou C, Li J, Wang Q, Zhu F, Ma C, Sun W, Zhang L. Frequent loss of PDCD4 expression in human glioma: possible role in the tumorigenesis of glioma. *Oncol Rep*. 2007;17(1):123–8.
- Gao W, Shen H, Liu L, Xu J, Xu J, Shu Y. MiR-21 overexpression in human primary squamous cell lung carcinoma is associated with poor patient prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011;137(4):557–66.
- Garshasbi M, Hadavi V, Habibi H, Kahrizi K, Kariminejad R, Behjati F, Tzschach A, Najmabadi H, Ropers HH, Kuss AW. A defect in the TUSC3 gene is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am. J Hum Genet*. 2008;82(5):1158–64.
- Garshasbi M, Kahrizi K, Hosseini M, Nouri Vahid L, Falah M, Hemmati S, Hu H, Tzschach A, Ropers HH, Najmabadi H, Kuss AW. A novel nonsense mutation in TUSC3 is responsible for non-syndromic autosomal recessive mental retardation in a consanguineous Iranian family. *Am J Med Genet A*. 2011;155(8):1976–80.
- Gibb HJ, Lees PSJ, Pinsky PF, Rooney BC. Lung cancer among workers in chromium chemical production. *Am J Ind Med*. 2000;38(2):115–26.
- Glassmann A, Molly S, Surchev L, Nazwar TA, Holst M, Hartmann W, Baader SL, Oberdick J, Pietsch T, Schilling K. Developmental expression and differentiation-related neuron-specific splicing of metastasis suppressor 1 (Mtss1) in normal and transformed cerebellar cells. *BMC Dev Biol*. 2007;7:111.
- Göke R, Barth P, Schmidt A, Samans B, Lankat-Buttgereit B. Programmed cell death protein 4 suppresses CDK1/cdc2 via induction of p21<sup>Waf1/Cip1</sup>. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(6):C1541–C1546.
- Grafstrom RC, Pegg AE, Trump BF, Harris CC. O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in normal human tissues and cells. *Cancer Res*. 1984;44(7):2855–7.
- Grote HJ, Schmiemann V, Geddert H, Böcking A, Kappes R, Gabbert HE, Sarbia M. Methylation of RAS association domain family protein 1A as a biomarker of lung cancer. *Cancer*. 2006;108(2):129–34.
- Grote HJ, Schmiemann V, Kazimirek M, Böcking A. Quantitative methylierungsspezifische PCR zur Lungenkarzinomdiagnostik [Quantitative methylation-specific PCR for the diagnosis of lung cancer]. *Pathologe*. 2007;28(5):377–83. German.
- Gu J, Berman D, Lu C, Wistuba II, Roth JA, Frazier M, Spitz MR, Wu X. Aberrant promoter methylation profile and association with survival in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12(24):7329–38.
- Gu Y, Wang Q, Guo K, Qin W, Liao W, Wang S, Ding Y, Lin J. TUSC3 promotes colorectal cancer progression and epithelial-mesenchymal transition (EMT) through WNT/ $\beta$ -catenin and MAPK signalling. *J Pathol*. 2016;239(1):60–71.
- Guo M, House MG, Hooker C, Han Y, Heath E, Gabrielson E, Yang SC, Baylin SB, Herman JG, Brock MV. Promoter hypermethylation of resected bronchial margins: a field defect of changes? *Clin Cancer Res*. 2004;10(15):5131–6.
- Gustafson CE, Wilson PJ, Lukeis R, Baker E, Woollatt E, Annab L, Hawke L, Barrett JC, Chenevix-Trench G. Functional evidence for a colorectal cancer tumor suppressor gene at chromosome 8p22-23 by monochromosome transfer. *Cancer Res*. 1996;56(22):5238–45.
- Guzmán L, Depix MS, Salinas AM, Roldán R, Aguayo F, Silva A, Vinet R. Analysis of aberrant methylation on promoter sequences of tumor suppressor genes and total DNA in sputum samples: a promising tool for early detection of COPD and lung cancer in smokers. *Diagn Pathol*. 2012;7:87.

- Han H, Silverman JF, Santucci TS, Macherey RS, d'Amato TA, Tung MY, Weyant RJ, Landreneau RJ. Vascular endothelial growth factor expression in stage I non-small cell lung cancer correlates with neoangiogenesis and a poor prognosis. *Ann Surg Oncol*. 2001;8(1):72–9.
- Hassler MR, Pfeifer W, Knocke-Abulesz TH, Geissler K, Altorjai G, Dieckmann K, Marosi C. Temozolomide added to whole brain radiotherapy in patients with multiple brain metastases of non-small-cell lung cancer: a multicentric Austrian phase II study. *Wien Klin Wochenschr*. 2013;125(15-16):481–6.
- Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, Richardson JA, Bassel-Duby R, van Rooij E, Olson EN. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21. *Cancer Cell*. 2010;18(3):282–93.
- He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004;5(7):522–31.
- He N, Li C, Zhang X, Sheng T, Chi S, Chen K, Wang Q, Vertrees R, Logrono R, Xie J. Regulation of lung cancer cell growth and invasiveness by  $\beta$ -TRCP. *Mol Carcinog*. 2005;42(1):18–28.
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):997–1003.
- Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(13):1367–80.
- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003;349(21):2042–54.
- Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(18):9821–6.
- Hesson L, Bièche I, Krex D, Criniere E, Hoang-Xuan K, Maher ER, Latif F. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A and BLU genes located within the critical 3p21.3 region in gliomas. *Oncogene*. 2004;23(13):2408–19.
- Hilliard A, Hilliard B, Zheng SJ, Sun H, Miwa T, Song W, Göke R, Chen YH. Translational regulation of autoimmune inflammation and lymphoma genesis by programmed cell death 4. *J Immunol*. 2006;177(11):8095–102.
- Hirata H, Ueno K, Shahryari V, Deng G, Tanaka Y, Tabatabai ZL, Hinoda Y, Dahiya R. MicroRNA-182-5p promotes cell invasion and proliferation by down regulating FOXF2, RECK and MTSS1 genes in human prostate cancer. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e55502.
- Hiyoshi Y, Kamohara H, Karashima R, Sato N, Imamura Y, Nagai Y, Yoshida N, Toyama E, Hayashi N, Watanabe M, Baba H. MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15(6):1915–22.
- Hoffmann AC, Kaifi JT, Vallböhmer D, Yekebas E, Grimminger P, Leers JM, Izicki JR, Hölscher AH, Schneider PM, Metzger R, Brabender J. Lack of prognostic significance of serum DNA methylation of DAPK, MGMT, and GSTPI in patients with non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol*. 2009;100(5):414–7.
- Horak P, Tomasich E, Anees M, Marhold M, Gerschpacher M, Pils D, Krainer M. TUSC3 (N33) affects protein N-glycosylation and proliferation of prostate cancer cells [abstract]. In: Proceedings of the 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2012 Mar 31-Apr 4; Chicago, IL. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res. 2012;72 Suppl 8. Abstract no 3997.
- Horak P, Tomasich E, Vaňhara P, Kratochvílová K, Anees M, Marhold M, Lemberger CE, Gerschpacher M, Horvat R, Sibilia M, Pils D, Krainer M. TUSC3 loss alters the ER stress response and accelerates prostate cancer growth in vivo. *Sci Rep*. 2014;4:3739.



- Huang J, Zheng D, Qin FS, Cheng N, Chen H, Wan BB, Wang YP, Xiao HS, Han ZG. Genetic and epigenetic silencing of SCARA5 may contribute to human hepatocellular carcinoma by activating FAK signaling. *J Clin Invest*. 2010;120(1):223–41.
- Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, Hampel H, Wright FA, Kornacker K, LiVolsi V, Frankel W, Kloos RT, Eng C, Pellegata NS, de la Chapelle A. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(26):15044–9.
- Hubers AJ, Heideman DAM, Herder GJM, Burgers SA, Sterk PJ, Kunst PW, Smit HJ, Postmus PE, Witte BI, Duin S, Snijders PJF, Smit EF, Thunnissen E. Prolonged sampling of spontaneous sputum improves sensitivity of hypermethylation analysis for lung cancer. *J Clin Pathol*. 2012;65(6):541–5.
- Hughes S, Yoshimoto M, Beheshti B, Houlston RS, Squire JA, Evans A. The use of whole genome amplification to study chromosomal changes in prostate cancer: insights into genome-wide signature of preneoplasia associated with cancer progression. *BMC Genomics*. 2006;7:65.
- Hung J, Kishimoto Y, Sugio K, Virmani A, McIntire DD, Minna JD, Gazdar AF. Allele-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma. *JAMA*. 1995;273(7):558–63.
- Hwang SK, Jin H, Kwon JT, Chang SH, Kim TH, Cho CS, Lee KH, Young MR, Colburn NH, Beck GR, Yang HS, Cho MH. Aerosol-delivered programmed cell death 4 enhanced apoptosis, controlled cell cycle and suppressed AP-1 activity in the lungs of AP-1 luciferase reporter mice. *Gene Ther*. 2007;14(18):1353–61.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. Lyon (France); 2004. 1438 p. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; 83).
- Illingworth RS, Bird AP. CpG islands – ‘A rough guide’. *FEBS Lett*. 2009;583(11):1713–20.
- Ingold B, Schraml P, Heppner FL, Moch H. Homogeneous MGMT immunoreactivity correlates with an unmethylated MGMT promoter status in brain metastases of various solid tumors. *PLoS ONE*. 2009;4(3):e4775.
- Ishii H, Baffa R, Numata SI, Murakumo Y, Rattan S, Inoue H, Mori M, Fidanza V, Alder H, Croce CM. The FEZ1 gene at chromosome 8p22 encodes a leucine-zipper protein, and its expression is altered in multiple human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(7):3928–33.
- Jahid S, Sun J, Edwards RA, Dizon D, Panarelli NC, Milsom JW, Sikandar SS, Gümüş ZH, Lipkin SM. miR-23a promotes the transition from indolent to invasive colorectal cancer. *Cancer Discov*. 2012;2(6):540–53.
- Jamaluddin MFB, Bailey UM, Tan NYJ, Stark AP, Schulz BL. Polypeptide binding specificities of *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase accessory proteins Ost3p and Ost6p. *Protein Sci*. 2011;20(5):849–55.
- Jansen AP, Camalier CE, Colburn NH. Epidermal expression of the translation inhibitor programmed cell death 4 suppresses tumorigenesis. *Cancer Res*. 2005;65(14):6034–41.
- Jansen AP, Camalier CE, Stark C, Colburn NH. Characterization of programmed cell death 4 in multiple human cancers reveals a novel enhancer of drug sensitivity. *Mol Cancer Ther*. 2004;3(2):103–10.
- Jenkins R, Takahashi S, DeLacey K, Bergstrahl E, Lieber M. Prognostic significance of allelic imbalance of chromosome arms 7q, 8p, 16q, and 18q in stage T3N0M0 prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998;21(2):131–43.
- Ji H, Ramsey MR, Hayes DN, Fan C, McNamara K, Kozlowski P, Torrice C, Wu MC, Shimamura T, Perera SA, Liang MC, Cai D, Naumov GN, Bao L, Contreras CM, Li D, Chen L, Krishnamurthy J, Koivunen J, Chirieac LR, Padera RF, Bronson RT, Lindeman NI, Christiani DC, Lin X, Shapiro GI, Jänne PA, Johnson BE, Meyerson M, Kwiatkowski DJ, Castrillon DH,

- Bardeesy N, Sharpless NE, Wong KK. LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature*. 2007;448(7155):807–10.
- Jiang F, Yin Z, Caraway NP, Li R, Katz RL. Genomic profiles in stage I primary non small cell lung cancer using comparative genomic hybridization analysis of cDNA microarrays. *Neoplasia*. 2004;6(5):623–35.
- Jiang Z, Guo M, Zhang X, Yao L, Shen J, Ma G, Liu L, Zhao L, Xie C, Liang H, Wang H, Zhu M, Hu L, Song Y, Shen H, Lin Z. TUSC3 suppresses glioblastoma development by inhibiting Akt signaling. *Tumor Biol*. 2016; 37(9):12039–12047.
- Jin H, Wang X, Ying J, Wong AHY, Cui Y, Srivastava G, Shen ZY, Li EM, Zhang Q, Jin J, Kupzig S, Chan ATC, Cullen PJ, Tao Q. Epigenetic silencing of a Ca<sup>2+</sup>-regulated Ras GTPase-activating protein RASAL defines a new mechanism of Ras activation in human cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(30):12353–8.
- Jin H, Kim TH, Hwang SK, Chang SH, Kim HW, Anderson HK, Lee HW, Lee KH, Colburn NH, Yang HS, Cho MH, Cho CS. Aerosol delivery of urocanic acid-modified chitosan/programmed cell death 4 complex regulated apoptosis, cell cycle, and angiogenesis in lungs of K-ras null mice. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(4):1041–9.
- Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007;128(4):683–92.
- Jones PA, Wolkowicz MJ, Rideout WM, Gonzales FA, Marziasz CM, Coetzee GA, Tapscott SJ. De novo methylation of the MyoD1 CpG island during the establishment of immortal cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87(16):6117–21.
- Junker K. Aktuelle morphologische Diagnostik bösartiger Lungentumoren [Current morphological diagnosis of malignant lung tumors]. *Pathologe*. 2006;27(2):90–8. German.
- Kaczmarczyk G, Lewandowski R, Trautsolt W, Ziółkowski A, Kozielski J. Cytological examination of pleural cavity lavage accompanied by the study of gene promoter hypermethylation of p16 and O6-methylguanine-DNA-methyltransferase genes in diagnostics of non-small cell lung cancer metastatic changes into pleura. *Wspolczesna Onkol*. 2012;16(4):322–7.
- Kahng YS, Lee YS, Kim BK, Park WS, Lee JY, Kang CS. Loss of heterozygosity of chromosome 8p and 11p in the dysplastic nodule and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003;18(4):430–6.
- Kalinichenko SV, Kopantzev EP, Korobko EV, Palgova IV, Zavalishina LE, Bateva MV, Petrov AN, Frank GA, Sverdlov ED, Korobko IV. Pcd4 protein and mRNA level alterations do not correlate in human lung tumors. *Lung Cancer*. 2008;62(2):173–80.
- Kamalakaran S, Kendall J, Zhao X, Tang C, Khan S, Ravi K, Auletta T, Riggs M, Wang Y, Helland A, Naume B, Dimitrova N, Borresen-Dale AL, Hicks J, Lucito R. Methylation detection oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method for detection of CpG island methylation. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(12):e89.
- Kaplan HA, Welply JK, Lennarz WJ. Oligosaccharyl transferase: the central enzyme in the pathway of glycoprotein assembly. *Biochim Biophys Acta*. 1987;906(2):161–73.
- Karaoglu D, Kelleher DJ, Gilmore R. Functional characterization of Ost3p. Loss of the 34-kD subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase results in biased underglycosylation of acceptor substrates. *J Cell Biol*. 1995;130(3):567–77.
- Kekeeva TV, Popova OP, Shegai PV, Alekseev BY, Andreeva YY, Zaletaev DV, Nemtsova MV. Aberrant methylation of p16, HIC1, N33, and GSTP1 in tumor epithelium and tumor-associated cells in prostate cancer. *Molekulyarnaya Biologiya*. 2007;41(1):79–85. Russian. Englische Version unter: *Mol Biol*. 2007;41(1):70–6.
- Kekeeva TV, Zhevlova AI, Podistov YI, Solov'eva YV, Zaletaev DV, Nemtsova MV. Aberrant methylation of tumor suppressor genes and allelic imbalance in cervical intraepithelial neoplasia.

- Molekulyarnaya Biologiya. 2006; 40(2):224–230. Russian. Englische Version unter: Mol. Biol 2006;40(2):194–9.
- Kelleher DJ, Karaoglu D, Mandon EC, Gilmore R. Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties. *Mol Cell*. 2003;12(1):101–11.
- Khan MA, Rafiq MA, Noor A, Ali N, Ali G, Vincent JB, Ansar M. A novel deletion mutation in the TUSC3 gene in a consanguineous Pakistani family with autosomal recessive nonsyndromic intellectual disability. *BMC Med Genet*. 2011;12:56.
- Kim DS, Cha SI, Lee JH, Lee YM, Choi JE, Kim MJ, Lim JS, Lee EB, Kim CH, Park TI, Jung TH, Park JY. Aberrant DNA methylation profiles of non-small cell lung cancers in a Korean population. *Lung Cancer*. 2007;58(1):1–6.
- Kim DH, Kim JS, Ji YI, Shim YM, Kim H, Han J, Park J. Hypermethylation of RASSF1A promoter is associated with the age at starting smoking and a poor prognosis in primary non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2003;63(13):3743–6.
- Kim H, Kwon YM, Kim JS, Lee H, Park JH, Shim YM, Han J, Park J, Kim DH. Tumor-specific methylation in bronchial lavage for the early detection of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22(12):2363–70.
- Kim H, Zamel R, Bai XH, Liu M, Chu HW. PKC activation induces inflammatory response and cell death in human bronchial epithelial cells. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e64182.
- Kleinerman RA, Wang Z, Wang L, Metayer C, Zhang S, Brenner AV, Zhang S, Xia Y, Shang B, Lubin JH. Lung cancer and indoor exposure to coal and biomass in rural China. *J Occup Environ Med*. 2002;44(4):338–44.
- Kloth JN, Oosting J, van Wezel T, Szuhai K, Knijnenburg J, Gorter A, Kenter GG, Fleuren GJ, Jordanova ES. Combined array-comparative genomic hybridization and single-nucleotide polymorphism-loss of heterozygosity analysis reveals complex genetic alterations in cervical cancer. *BMC Genomics*. 2007;8:53.
- Knauer R, Lehle L. The oligosaccharyltransferase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of the OST6 gene, its synthetic interaction with OST3, and analysis of the native complex. *J Biol Chem*. 1999;274(24):17249–56.
- Kolfschoten IGM, van Leeuwen B, Berns K, Mullenders J, Beijersbergen RL, Bernards R, Voorhoeve PM, Agami R. A genetic screen identifies PITX1 as a suppressor of RAS activity and tumorigenicity. *Cell*. 2005;121(6):849–58.
- Kontic M, Stojic J, Jovanovic D, Bunjevacki V, Ognjanovic S, Kuriger J, Puumala S, Nelson HH. Aberrant promoter methylation of CDH13 and MGMT genes is associated with clinicopathologic characteristics of primary non-small-cell lung carcinoma. *Clin Lung Cancer*. 2012;13(4):297–303.
- Kristensen LS, Mikeska T, Krypuy M, Dobrovic A. Sensitive melting analysis after real time-methylation specific PCR (SMART-MSP): high-throughput and probe-free quantitative DNA methylation detection. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(7):e42.
- Kubo T, Yamamoto H, Ichimura K, Jida M, Hayashi T, Otani H, Tsukuda K, Sano Y, Kiura K, Toyooka S. DNA methylation in small lung adenocarcinoma with bronchioloalveolar carcinoma components. *Lung Cancer*. 2009;65(3):328–32.
- Kuhn H, Köpf C, Konrad J, Riedel A, Gessner C, Wirtz H. Influence of basic fibroblast growth factor on the proliferation of non-small cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer*. 2004;44(2):167–74.
- Kumar V, Korza G, Heinemann FS, Ozols J. Human oligosaccharyltransferase: isolation, characterization, and the complete amino acid sequence of 50-kDa subunit. *Arch Biochem Biophys*. 1995;320(2):217–23.

- Kupzig S, Deaconescu D, Bouyoucef D, Walker SA, Liu Q, Polte CL, Daumke O, Ishizaki T, Lockyer PJ, Wittinghofer A, Cullen PJ. GAP1 family members constitute bifunctional Ras and Rap GTPase-activating proteins. *J Biol Chem.* 2006;281(15):9891–900.
- Kuzmin I, Gillespie JW, Protopopov A, Geil L, Dreijerink K, Yang Y, Vocke CD, Duh FM, Zabarovsky E, Minna JD, Rhim JS, Emmert-Buck MR, Linehan WM, Lerman MI. The RASSF1A tumor suppressor gene is inactivated in prostate tumors and suppresses growth of prostate carcinoma cells. *Cancer Res.* 2002;62(12):3498–502.
- Kuzmin I, Liu L, Dammann R, Geil L, Stanbridge EJ, Wilczynski SP, Lerman MI, Pfeifer GP. Inactivation of RAS association domain family 1A gene in cervical carcinomas and the role of human papillomavirus infection. *Cancer Res.* 2003;63(8):1888–93.
- Laffaire J, Everhard S, Idbaih A, Crinière E, Marie Y, de Reyniès A, Schiappa R, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Sanson M, Delattre JY, Thillet J, Ducray F. Methylation profiling identifies 2 groups of gliomas according to their tumorigenesis. *Neuro Oncol.* 2011;13(1):84–98.
- Lam DCL, Girard L, Suen WS, Chung LP, Tin VPC, Lam WK, Minna JD, Wong MP. Establishment and expression profiling of new lung cancer cell lines from Chinese smokers and lifetime never-smokers. *J Thorac Oncol.* 2006;1(9):932–42.
- Lankat-Buttgereit B, Gregel C, Knolle A, Hasilik A, Arnold R, Göke R. Pdc4 inhibits growth of tumor cells by suppression of carbonic anhydrase type II. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;214(1-2):149–53.
- Lankat-Buttgereit B, Lenschen B, Schmidt H, Göke R. The action of Pdc4 may be cell type specific: evidence that reduction of dUTPase levels might contribute to its tumor suppressor activity in Bon-1 cells. *Apoptosis.* 2008;13(1):157–64.
- Lee MG, Kim HY, Byun DS, Lee SJ, Lee CH, Kim JI, Chang SG, Chi SG. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A in human bladder carcinoma. *Cancer Res.* 2001;61(18):6688–92.
- Lee SM, Lee WK, Kim DS, Park JY. Quantitative promoter hypermethylation analysis of RASSF1A in lung cancer: comparison with methylation-specific PCR technique and clinical significance. *Mol Med Rep.* 2012;5(1):239–44.
- Lee SH, Kerff F, Chereau D, Ferron F, Klug A, Dominguez R. Structural basis for the actin-binding function of missing-in-metastasis. *Structure.* 2007;15(2):145–55.
- Lee YG, Macoska JA, Korenchuk S, Pienta KJ. MIM, a potential metastasis suppressor gene in bladder cancer. *Neoplasia.* 2002;4(4):291–4.
- Leng S, Bernauer AM, Hong C, Do KC, Yingling CM, Flores KG, Tessema M, Tellez CS, Willink RP, Burki EA, Picchi MA, Stidley CA, Prados MD, Costello JF, Gilliland FD, Crowell RE, Belinsky SA. The A/G allele of rs16906252 predicts for MGMT methylation and is selectively silenced in premalignant lesions from smokers and in lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 2011;17(7):2014–23.
- Leng S, Do K, Yingling CM, Picchi MA, Wolf HJ, Kennedy TC, Feser WJ, Baron AE, Franklin WA, Brock MV, Herman JG, Baylin SB, Byers T, Stidley CA, Belinsky SA. Defining a gene promoter methylation signature in sputum for lung cancer risk assessment. *Clin Cancer Res.* 2012;18(12):3387–95.
- Lerman MI, Minna JD; The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. *Cancer Res.* 2000;60(21):6116–33.
- Leupold JH, Asangani IA, Mudduluru G, Allgayer H. Promoter cloning and characterization of the human programmed cell death protein 4 (pdc4) gene: evidence for ZBP-89 and Sp-binding motifs as essential Pdc4 regulators. *Biosci. Rep.* 2012;32(3):281–97.

- Leupold JH, Yang HS, Colburn NH, Asangani IA, Post S, Allgayer H. Tumor suppressor Pcd4 inhibits invasion/intravasation and regulates urokinase receptor (u-PAR) gene expression via Sp-transcription factors. *Oncogene*. 2007;26(31):4550–62.
- Levy A, Dang UC, Bookstein R. High-density screen of human tumor cell lines for homozygous deletions of loci on chromosome arm 8p. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999;24(1):42–7.
- Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*. 1993;366(6453):362–5.
- Li J, Fu H, Xu C, Tie Y, Xing R, Zhu J, Qin Y, Sun Z, Zheng X. miR-183 inhibits TGF- $\beta$ 1-induced apoptosis by downregulation of PDCD4 expression in human hepatocellular carcinoma cells. *BMC Cancer*. 2010;10:354.
- Li Q, Jedlicka A, Ahuja N, Gibbons MC, Baylin SB, Burger PC, Issa JPI. Concordant methylation of the ER and N33 genes in glioblastoma multiforme. *Oncogene*. 1998;16(24):3197–202.
- Li W, Deng J, Jiang P, Zeng X, Hu S, Tang J. Methylation of the RASSF1A and RAR $\beta$  genes as a candidate biomarker for lung cancer. *Exp Ther Med*. 2012;3(6):1067–71.
- Li X, Xin S, Yang D, Li X, He Z, Che X, Wang J, Chen F, Wang X, Song X. Down-regulation of PDCD4 expression is an independent predictor of poor prognosis in human renal cell carcinoma patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138(3):529–35.
- Li X, Pennisi A, Zhan F, Sawyer JR, Shaughnessy JD, Yaccoby S. Establishment and exploitation of hyperdiploid and non-hyperdiploid human myeloma cell lines. *Br J Haematol*. 2007;138(6):802–11.
- Licchesi JDF, Westra WH, Hooker CM, Herman JG. Promoter hypermethylation of hallmark cancer genes in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Clin Cancer Res*. 2008;14(9):2570–8.
- Lin J, Liu J, Wang Y, Zhu J, Zhou K, Smith N, Zhan X. Differential regulation of cortactin and N-WASP-mediated actin polymerization by missing in metastasis (MIM) protein. *Oncogene*. 2005;24(12):2059–66.
- Lin Q, Geng J, Ma K, Yu J, Sun J, Shen Z, Bao G, Chen Y, Zhang H, He Y, Luo X, Feng X, Zhu J. RASSF1A, APC, ESR1, ABCB1 and HOXC9, but not p16INK4A, DAPK1, PTEN and MT1G genes were frequently methylated in the stage I non-small cell lung cancer in China. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009;135(12):1675–84.
- Lindahl T. DNA methyl transferase acting on O<sup>6</sup>-methylguanine residues in adapted E. coli. In: Seeberg E, Kleppe K, editors. *Chromosome damage and repair*. New York, London: Plenum Press; 1981. p. 207–17.
- Liu D, Yang C, Bojdani E, Murugan AK, Xing M. Identification of RASAL1 as a major tumor suppressor gene in thyroid cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(21):1617–27.
- Liu K, Wang G, Ding H, Chen Y, Yu G, Wang J. Downregulation of metastasis suppressor 1(MTSS1) is associated with nodal metastasis and poor outcome in Chinese patients with gastric cancer. *BMC Cancer*. 2010;10:428.
- Liu L, Tommasi S, Lee DH, Dammann R, Pfeifer GP. Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor. *Oncogene*. 2003;22(50):8125–36.
- Liu S, Guo W, Shi J, Li N, Yu X, Xue J, Fu X, Chu K, Lu C, Zhao J, Xie D, Wu M, Cheng S, Liu S. MicroRNA-135a contributes to the development of portal vein tumor thrombus by promoting metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2012;56(2):389–96.
- Liu SV, Fabbri M, Gitlitz BJ, Laird-Offringa IA. Epigenetic therapy in lung cancer. *Front Oncol*. 2013;3:135.
- Liu W, Komiya Y, Mezzacappa C, Khadka DK, Runnels L, Habas R. MIM regulates vertebrate neural tube closure. *Development*. 2011;138(10):2035–47.

- Liu X, Zhang Z, Sun L, Chai N, Tang S, Jin J, Hu H, Nie Y, Wang X, Wu K, Jin H, Fan D. MicroRNA-499-5p promotes cellular invasion and tumor metastasis in colorectal cancer by targeting FOXO4 and PDCD4. *Carcinogenesis*. 2011;32(12):1798–805.
- Liu Y, Lan Q, Shen M, Jin J, Mumford J, Ren D, Keohavong P. Aberrant gene promoter methylation in sputum from individuals exposed to smoky coal emissions. *Anticancer Res*. 2008;28(4B):2061–6.
- Liu Y, Lan Q, Siegfried JM, Luketich JD, Keohavong P. Aberrant promoter methylation of p16 and MGMT genes in lung tumors from smoking and never-smoking lung cancer patients. *Neoplasia*. 2006;8(1):46–51.
- Liu Z, Li W, Lei Z, Zhao J, Chen XF, Liu R, Peng X, Wu ZH, Chen J, Liu H, Zhou QH, Zhang HT. CpG island methylator phenotype involving chromosome 3p confers an increased risk of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2010;5(6):790–7.
- Liu Z, Zhao J, Chen XF, Li W, Liu R, Lei Z, Liu X, Peng X, Xu K, Chen J, Liu H, Zhou QH, Zhang HT. CpG island methylator phenotype involving tumor suppressor genes located on chromosome 3p in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2008;62(1):15–22.
- Liu Z, Liu J, Segura MF, Shao C, Lee P, Gong Y, Hernando E, Wei JJ. MiR-182 overexpression in tumorigenesis of high-grade serous ovarian carcinoma. *J Pathol*. 2012;228(2):204–15.
- Liwak U, Thakor N, Jordan LE, Roy R, Lewis SM, Pardo OE, Seckl M, Holcik M. Tumor suppressor PDCD4 represses internal ribosome entry site-mediated translation of antiapoptotic proteins and is regulated by S6 kinase 2. *Mol Cell Biol*. 2012;32(10):1818–29.
- Loddo S, Parisi V, Doccini V, Filippi T, Bernardini L, Brovedani P, Ricci F, Novelli A, Battaglia A. Homozygous deletion in TUSC3 causing syndromic intellectual disability: A new patient. *Am J Med Genet A*. 2013;161(8):2084–7.
- Loh PG, Yang HS, Walsh MA, Wang Q, Wang X, Cheng Z, Liu D, Song H. Structural basis for translational inhibition by the tumour suppressor Pdc4. *EMBO J*. 2009;28(3):274–85.
- Lu Z, Liu M, Stribinskis V, Klinge CM, Ramos KS, Colburn NH, Li Y. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene*. 2008;27(31):4373–9.
- Lubin JH, Boice JD, Edling C, Hornung RW, Howe GR, Kunz E, Kusiak RA, Morrison HI, Radford EP, Samet JM, Tirmarche M, Woodward A, Yao SX, Pierce DA. Lung cancer in radon-exposed miners and estimation of risk from indoor exposure. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(11):817–27.
- Lukas RV, Nicholas MK, Villaflor V, Hoffman PC, Salgia R. Temozolomide and/or erlotinib in the treatment of lung cancer patients with progressive central nervous system metastases. *J Neurol Res*. 2012;2(1):1–9.
- Ma BBY, Sung F, Tao Q, Poon FF, Lui VW, Yeo W, Chan SL, Chan ATC. The preclinical activity of the histone deacetylase inhibitor PXD101 (belinostat) in hepatocellular carcinoma cell lines. *Invest New Drugs*. 2010;28(2):107–14.
- Ma G, Guo KJ, Zhang H, Ozaki I, Matsushashi S, Zheng XY, Dong M. [Expression of programmed cell death 4 and its clinicopathological significance in human pancreatic cancer]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2005;27(5):597–600. Chinese.
- Ma S, Guan XY, Lee TK, Chan KW. Clinicopathological significance of missing in metastasis B expression in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol*. 2007;38(8):1201–6.
- MacGrogan D, Levy A, Bova GS, Isaacs WB, Bookstein R. Structure and methylation-associated silencing of a gene within a homozygously deleted region of human chromosome band 8p22. *Genomics*. 1996;35(1):55–65.
- Maddugoda MP, Stefani C, Gonzalez-Rodriguez D, Saarikangas J, Torrino S, Janel S, Munro P, Doye A, Prodon F, Aurrand-Lions M, Goossens PL, Lafont F, Bassereau P, Lappalainen P,

- Brochard F, Lemichez E. cAMP signaling by anthrax edema toxin induces transendothelial cell tunnels, which are resealed by MIM via Arp2/3-driven actin polymerization. *Cell Host Microbe*. 2011;10(5):464–74.
- Mao L, Lee JS, Kurie JM, Fan YH, Lippman SM, Lee JJ, Ro JY, Broxson A, Yu R, Morice RC, Kemp BL, Khuri FR, Walsh GL, Hittelman WN, Hong WK. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(12):857–62.
- Mao WM, Li P, Zheng QQ, Wang CC, Ge MH, Hu FJ, Fang XH, Dong ZM, Ling ZQ. Hypermethylation-modulated downregulation of RASSF1A expression is associated with the progression of esophageal cancer. *Arch Med Res*. 2011;42(3):182–8.
- Maruyama R, Sugio K, Yoshino I, Maehara Y, Gazdar AF. Hypermethylation of FHIT as a prognostic marker in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2004;100(7):1472–7.
- Matallanas D, Romano D, Yee K, Meissl K, Kucerova L, Piazzolla D, Baccarini M, Vass JK, Kolch W, O'Neill E. RASSF1A elicits apoptosis through an MST2 pathway directing proapoptotic transcription by the p73 tumor suppressor protein. *Mol Cell*. 2007;27(6):962–75.
- Matsushashi S, Narisawa Y, Ozaki I, Mizuta T. Expression patterns of programmed cell death 4 protein in normal human skin and some representative skin lesions. *Exp Dermatol*. 2007;16(3):179–84.
- Mattila PK, Pykäläinen A, Saarikangas J, Paavilainen VO, Vihinen H, Jokitalo E, Lappalainen P. Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P<sub>2</sub>-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism. *J Cell Biol*. 2007;176(7):953–64.
- Mattila PK, Salminen M, Yamashiro T, Lappalainen P. Mouse MIM, a tissue-specific regulator of cytoskeletal dynamics, interacts with ATP-actin monomers through its C-terminal WH2 domain. *J Biol Chem*. 2003;278(10):8452–9.
- McDonald FE, Morris MR, Gentle D, Winchester L, Baban D, Ragoussis J, Clarke NW, Brown MD, Kishida T, Yao M, Latif F, Maher ER. CpG methylation profiling in VHL related and VHL unrelated renal cell carcinoma. *Mol Cancer*. 2009;8:31.
- Meng H, Murrelle EL, Li G. Identification of a small optimal subset of CpG sites as bio-markers from high-throughput DNA methylation profiles. *BMC Bioinformatics*. 2008;9:457.
- Merline R, Moreth K, Beckmann J, Nastase MV, Zeng-Brouwers J, Tralhão JG, Lemarchand P, Pfeilschifter J, Schaefer RM, Iozzo RV, Schaefer L. Signaling by the matrix proteoglycan decorin controls inflammation and cancer through PDCD4 and MicroRNA-21. *Sci Signal*. 2011;4(199):ra75.
- Mikeska T, Bock C, El-Maarri O, Hübner A, Ehrentraut D, Schramm J, Felsberg J, Kahl P, Büttner R, Pietsch T, Waha A. Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *J Mol Diagn*. 2007;9(3):368–81.
- Miller CW, Simon K, Aslo A, Kok K, Yokota J, Buys CHCM, Terada M, Koeffler HP. p53 mutations in human lung tumors. *Cancer Res*. 1992;52(7):1695–8.
- Molinari F, Foulquier F, Tarpey PS, Morelle W, Boissel S, Teague J, Edkins S, Futreal PA, Stratton MR, Turner G, Matthijs G, Gecz J, Munnich A, Colleaux L. Oligosaccharyltransferase-subunit mutations in nonsyndromic mental retardation. *Am J Hum Genet*. 2008;82(5):1150–7.
- Motoyama K, Inoue H, Mimori K, Tanaka F, Kojima K, Uetake H, Sugihara K, Mori M. Clinicopathological and prognostic significance of PDCD4 and microRNA-21 in human gastric cancer. *Int J Oncol*. 2010;36(5):1089–95.
- Mudduluru G, Medved F, Grobholz R, Jost C, Gruber A, Leupold JH, Post S, Jansen A, Colburn NH, Allgayer H. Loss of programmed cell death 4 expression marks adenoma-carcinoma transition, correlates inversely with phosphorylated protein kinase B, and is an independent prognostic factor in resected colorectal cancer. *Cancer*. 2007;110(8):1697–707.

- Mumford JL, Li X, Hu F, Lu XB, Chuang JC. Human exposure and dosimetry of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine from Xuan Wei, China with high lung cancer mortality associated with exposure to unvented coal smoke. *Carcinogenesis*. 1995;16(12):3031–6.
- Mustafa N, Martin TA, Jiang WG. Metastasis tumour suppressor-1 and the aggressiveness of prostate cancer cells. *Exp Ther Med*. 2011;2(1):157–62.
- Myöhänen SK, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation can selectively silence individual p16<sup>ink4A</sup> alleles in neoplasia. *Cancer Res*. 1998;58(4):591–3.
- Nakashima M, Hamajima H, Xia J, Iwane S, Kwaguchi Y, Eguchi Y, Mizuta T, Fujimoto K, Ozaki I, Matsuhashi S. Regulation of tumor suppressor PDCD4 by novel protein kinase C isoforms. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803(9):1020–7.
- Natarajan AT, Vermeulen S, Darroudi F, Valentine MB, Brent TP, Mitra S, Tano K. Chromosomal localization of human O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene by in situ hybridization. *Mutagenesis*. 1992;7(1):83–5.
- Need AC, Ge D, Weale ME, Maia J, Feng S, Heinzen EL, Shianna KV, Yoon W, Kasperavičiūtė D, Gennarelli M, Strittmatter WJ, Bonvicini C, Rossi G, Jayathilake K, Cola PA, McEvoy JP, Keefe RSE, Fisher EMC, St Jean PL, Giegling I, Hartmann AM, Möller HJ, Ruppert A, Fraser G, Crombie C, Middleton LT, St Clair D, Roses AD, Muglia P, Francks C, Rujescu D, Meltzer HY, Goldstein DB. A genome-wide investigation of SNPs and CNVs in schizophrenia. *PLoS Genet*. 2009;5(2):e1000373.
- Nelson HH, Marsit CJ, Christensen BC, Houseman EA, Kontic M, Wiemels JL, Karagas MR, Wrensch MR, Zheng S, Wiencke JK, Kelsey KT. Key epigenetic changes associated with lung cancer development: Results from dense methylation array profiling. *Epigenetics*. 2012;7(6):559–66.
- Nieves-Alicea R, Colburn NH, Simeone AM, Tari AM. Programmed cell death 4 inhibits breast cancer cell invasion by increasing tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;114(2):203–9.
- Niklinska W, Naumnik W, Sulewska A, Kozłowski M, Pankiewicz W, Milewski R. Prognostic significance of DAPK and RASSF1A promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Folia Histochem Cytobiol*. 2009;47(2):275–80.
- Nilsson I, Kelleher DJ, Miao Y, Shao Y, Kreibich G, Gilmore R, von Heijne G., Johnson AE. Photocross-linking of nascent chains to the STT3 subunit of the oligosaccharyltransferase complex. *J Cell Biol*. 2003;161(4):715–25.
- Nixdorf S, Grimm MO, Loberg R, Marreiros A, Russell PJ, Pienta KJ, Jackson P. Expression and regulation of MIM (Missing In Metastasis), a novel putative metastasis suppressor gene, and MIM-B, in bladder cancer cell lines. *Cancer Lett*. 2004;215(2):209–20.
- Noma K, Smalley KSM, Lioni M, Naomoto Y, Tanaka N, El-Deiry W, King AJ, Nakagawa H, Herlyn M. The essential role of fibroblasts in esophageal squamous cell carcinoma-induced angiogenesis. *Gastroenterology*. 2008;134(7):1981–93.
- Oba K, Matsuyama H, Yoshihiro S, Kishi F, Takahashi M, Tsukamoto M, Kinjo M, Sagiya K, Naito K. Two putative tumor suppressor genes on chromosome arm 8p may play different roles in prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001;124(1):20–6.
- Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Cantor M, Kirkner GJ, Spiegelman D, Makrigiorgos GM, Weisenberger DJ, Laird PW, Loda M, Fuchs CS. Precision and performance characteristics of bisulfite conversion and real-time PCR (MethyLight) for quantitative DNA methylation analysis. *J Mol Diagn*. 2006;8(2):209–17.
- Oh HJ, Lee KK, Song SJ, Jin MS, Song MS, Lee JH, Im CR, Lee JO, Yonehara S, Lim DS. Role of the tumor suppressor RASSF1A in Mst1-mediated apoptosis. *Cancer Res*. 2006;66(5):2562–9.



- Ohgaki K, Iida A, Ogawa O, Kubota Y, Akimoto M, Emi M. Localization of tumor suppressor gene associated with distant metastasis of urinary bladder cancer to a 1-Mb interval on 8p22. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999;25(1):1–5.
- Ohta M, Seto M, Ijichi H, Miyabayashi K, Kudo Y, Mohri D, Asaoka Y, Tada M, Tanaka Y, Ikenoue T, Kanai F, Kawabe T, Omata M. Decreased expression of the RAS-GTPase activating protein RASAL1 is associated with colorectal tumor progression. *Gastroenterology*. 2009;136(1):206–16.
- Olsson M, Lindahl T. Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*: Methyl group transfer from O<sup>6</sup>-methylguanine to a protein cysteine residue. *J Biol Chem*. 1980;255(22):10569–71.
- O'Riain C, O'Shea DM, Yang Y, Le Dieu R, Gribben JG, Summers K, Yeboah-Afari J, Bhaw-Rosun L, Fleischmann C, Mein CA, Crook T, Smith P, Kelly G, Rosenwald A, Ott G, Campo E, Rimsza LM, Smeland EB, Chan WC, Johnson N, Gascoyne RD, Reimer S, Braziel RM, Wright GW, Staudt LM, Lister TA, Fitzgibbon J. Array-based DNA methylation profiling in follicular lymphoma. *Leukemia*. 2009;23(10):1858–66.
- Ortiz-Vega S, Khokhlatchev A, Nedwidek M, Zhang XF, Dammann R, Pfeifer GP, Avruch J. The putative tumor suppressor RASSF1A homodimerizes and heterodimerizes with the Ras-GTP binding protein Nore1. *Oncogene*. 2002;21(9):1381–90.
- Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, Aqeilan RI, Croce CM, Pekarsky Y. Akt phosphorylates and regulates Pcd4 tumor suppressor protein. *Cancer Res*. 2005;65(24):11282–6.
- Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, Belinsky SA. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res*. 2000;60(21):5954–8.
- Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris MG, Varmus H. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med*. 2005;2(3):e73.
- Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(36):13306–11.
- Park IW, Wistuba II, Maitra A, Milchgrub S, Virmani AK, Minna JD, Gazdar AF. Multiple clonal abnormalities in the bronchial epithelium of patients with lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(21):1863–8.
- Parkin DM. 2. Tobacco-attributable cancer burden in the UK in 2010. *Br. J. Cancer*. 2011;105 Suppl 2:S6-S13.
- Parr C, Jiang WG. Metastasis suppressor 1 (MTSS1) demonstrates prognostic value and anti-metastatic properties in breast cancer. *Eur J Cancer*. 2009;45(9):1673–83.
- Pasini A, Paganelli G, Tesei A, Zoli W, Giordano E, Calistri D. Specific biomarkers are associated with docetaxel and gemcitabine-resistant NSCLC cell lines. *Transl Oncol*. 2012;5(6):461–8.
- Pegg AE, Roberfroid M, von Bahr C, Foote RS, Mitra S, Bresil H, Likhachev A, Montesano R. Removal of O<sup>6</sup>-methylguanine from DNA by human liver fractions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982;79(17):5162–5.
- Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA*. 2005;11(12):1753–61.
- Pils D, Horak P, Gleiss A, Sax C, Fabjani G, Moebus VJ, Zielinski C, Reinthaller A, Zeillinger R, Krainer M. Five genes from chromosomal band 8p22 are significantly down-regulated in ovarian carcinoma: N33 and EFA6R have a potential impact on overall survival. *Cancer*. 2005;104(11):2417–29.

- Pils D, Horak P, Vanhara P, Anees M, Petz M, Alfanz A, Gugerell A, Wittinger M, Gleiss A, Auner V, Tong D, Zeillinger R, Braicu EI, Schouli J, Krainer M. Methylation status of TUSC3 is a prognostic factor in ovarian cancer. *Cancer*. 2013;119(5):946–54.
- Pribill I, Speiser P, Leary J, Leodolter S, Hacker NF, Friedlander ML, Birnbaum D, Zeillinger R, Krainer M. High frequency of allelic imbalance at regions of chromosome arm 8p in ovarian carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001;129(1):23–9.
- Pulling LC, Divine KK, Klinge DM, Gilliland FD, Kang T, Schwartz AG, Bocklage TJ, Belinsky SA. Promoter hypermethylation of the O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase gene: more common in lung adenocarcinomas from never-smokers than smokers and associated with tumor progression. *Cancer Res*. 2003;63(16):4842–8.
- Qiao F, Su X, Qiu X, Qian D, Peng X, Chen H, Zhao Z, Fan H. Enforced expression of RASAL1 suppresses cell proliferation and the transformation ability of gastric cancer cells. *Oncol Rep*. 2012;28(4):1475–81.
- Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, Hoffmann B, Fischer P, Nieuwenhuijsen MJ, Brunekreef B, Xun WW, Katsouyanni K, Dimakopoulou K, Sommar J, Forsberg B, Modig L, Oudin A, Oftedal B, Schwarze PE, Nafstad P, de Faire U, Pedersen NL, Östenson CG, Fratiglioni L, Penell J, Korek M, Pershagen G, Eriksen KT, Sørensen M, Tjønneland A, Ellermann T, Eeftens M, Peeters PH, Meliefste K, Wang M, Bueno-de-Mesquita B, Key TJ, de Hoogh K, Concin H, Nagel G, Vilier A, Grioni S, Krogh V, Tsai MY, Ricceri F, Sacerdote C, Galassi C, Migliore E, Ranzi A, Cesaroni G, Badaloni C, Forastiere F, Tamayo I, Amiano P, Dorronsoro M, Trichopoulou A, Bamia C, Vineis P, Hoek G. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol*. 2013;14(9):813–22.
- Rabizadeh S, Xavier RJ, Ishiguro K, Bernabeortiz J, Lopez-Illasaca M, Khokhlatchev A, Mollahan P, Pfeifer G. P., Avruch J, Seed B. The scaffold protein CNK1 interacts with the tumor suppressor RASSF1A and augments RASSF1A-induced cell death. *J Biol Chem*. 2004;279(28):29247–54.
- Ramdas L, Giri U, Ashorn CL, Coombes KR, El-Naggar A, Ang KK, Story MD. miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. *Head Neck*. 2009;31(5):642–54.
- Rand K, Qu W, Ho T, Clark SJ, Molloy P. Conversion-specific detection of DNA methylation using real-time polymerase chain reaction (ConLight-MSP) to avoid false positives. *Methods*. 2002;27(2):114–20.
- Rauch TA, Wu X, Zhong X, Riggs AD, Pfeifer GP. A human B cell methylome at 100-base pair resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(3):671–8.
- Reis PP, Tomenson M, Cervigne NK, Machado J, Jurisica I, Pintilie M, Sukhai MA, Perez-Ordóñez B, Grénman R, Gilbert RW, Gullane PJ, Irish JC, Kamel-Reid S. Programmed cell death 4 loss increases tumor cell invasion and is regulated by miR-21 in oral squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*. 2010;9:238.
- Ribeiro IP, Marques F, Caramelo F, Pereira J, Patrício M, Prazeres H, Ferrão J, Julião MJ, Castelo-Branco M, de Melo JB, Baptista IP, Carreira IM. Genetic gains and losses in oral squamous cell carcinoma: impact on clinical management. *Cell Oncol*. 2014;37(1):29–39.
- Rideout WM, Coetzee GA, Olumi AF, Jones PA. 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science*. 1990;249(4974):1288–90.
- Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale DA, Nafa K, Riedel ER, Hsu M, Pao W, Miller VA, Ladanyi M. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(18):5731–4.
- Risch A, Plass C. Lung cancer epigenetics and genetics. *Int J Cancer*. 2008;123(1):1–7.

- Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., editors. Krebs in Deutschland 2009/2010 [Cancer in Germany 2009/2010]. 9th ed. Berlin (Germany): Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; 2013. 146 p.
- Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, Calin GA, Volinia S, Liu CG, Scarpa A, Croce CM. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol*. 2006;24(29):4677–84.
- Rong R, Jin W, Zhang J, Sheikh MS, Huang Y. Tumor suppressor RASSF1A is a microtubule-binding protein that stabilizes microtubules and induces G2/M arrest. *Oncogene*. 2004;23(50):8216–30.
- Rosell R, Bivona TG, Karachaliou N. Genetics and biomarkers in personalisation of lung cancer treatment. *Lancet*. 2013;382(9893):720–31.
- Rozen F, Edery I, Meerovitch K, Dever TE, Merrick WC, Sonenberg N. Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol Cell Biol*. 1990;10(3):1134–44.
- Russo AL, Thiagalingam A, Pan H, Califano J, Cheng KH, Ponte JF, Chinnappan D, Nemani P, Sidransky D, Thiagalingam S. Differential DNA hypermethylation of critical genes mediates the stage-specific tobacco smoke-induced neoplastic progression of lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(7):2466–70.
- Rydberg B, Spurr N, Karran P. cDNA cloning and chromosomal assignment of the human O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase. cDNA expression in *Escherichia coli* and gene expression in human cells. *J Biol Chem*. 1990;265(16):9563–9.
- Saarikangas J, Mattila PK, Varjosalo M, Bovellan M, Hakanen J, Calzada-Wack J, Tost M, Jennen L, Rathkolb B, Hans W, Horsch M, Hyvönen ME, Perälä N, Fuchs H, Gailus-Durner V, Esposito I, Wolf E, de Angelis MH, Frilander MJ, Savilahti H, Sariola H, Sainio K, Lehtonen S, Taipale J, Salminen M, Lappalainen P. Missing-in-metastasis MIM/MTSS1 promotes actin assembly at intercellular junctions and is required for integrity of kidney epithelia. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 8):1245–55.
- Saarikangas J, Zhao H, Pykäläinen A, Laurinmäki P, Mattila PK, Kinnunen PKJ, Butcher SJ, Lappalainen P. Molecular mechanisms of membrane deformation by I-BAR domain proteins. *Curr Biol*. 2009;19(2):95–107.
- Sacomanno G, Archer VE, Auerbach O, Saunders RP, Brennan LM. Development of carcinoma of the lung as reflected in exfoliated cells. *Cancer*. 1974;33(1):256–70.
- Safar AM, Spencer H, Su X, Coffey M, Cooney CA, Ratnasinghe LD, Hutchins LF, Fan CY. Methylation profiling of archived non-small cell lung cancer: a promising prognostic system. *Clin Cancer Res*. 2005;11(12):4400–5.
- Salnikow K, Zhitkovich A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. *Chem Res Toxicol*. 2008;21(1):28–44.
- Sapienza C, Peterson AC, Rossant J, Balling R. Degree of methylation of transgenes is dependent on gamete of origin. *Nature*. 1987;328(6127):251–4.
- Sapkota A, Gajalakshmi V, Jetly DH, Roychowdhury S, Dikshit RP, Brennan P, Hashibe M, Boffetta P. Indoor air pollution from solid fuels and risk of hypopharyngeal/laryngeal and lung cancers: a multicentric case-control study from India. *Int J Epidemiol*. 2008;37(2):321–8.
- Sato S, Nakamura Y, Tsuchiya E. Difference of allelotype between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res*. 1994;54(21):5652–5.
- Scesnaite A, Jarmalaite S, Mutanen P, Anttila S, Nyberg F, Benhamou S, Boffetta P, Husgafvel-Pursiainen K. Similar DNA methylation pattern in lung tumours from smokers and never-smokers with second-hand tobacco smoke exposure. *Mutagenesis*. 2012;27(4):423–9.

- Schagdarsurengin U, Gimm O, Hoang-Vu C, Dralle H, Pfeifer GP, Dammann R. Frequent epigenetic silencing of the CpG island promoter of RASSF1A in thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 2002;62(13):3698–701.
- Schmid T, Bajer MM, Blees JS, Eifler LK, Milke L, Rübsamen D, Schulz K, Weigert A, Baker AR, Colburn NH, Brüne B. Inflammation-induced loss of Pdc4 is mediated by phosphorylation-dependent degradation. *Carcinogenesis.* 2011;32(10):1427–33.
- Schmid T, Jansen AP, Baker AR, Hegamyer G, Hagan JP, Colburn NH. Translation inhibitor Pdc4 is targeted for degradation during tumor promotion. *Cancer Res.* 2008;68(5):1254–60.
- Schmiemann V, Böcking A, Kazimirek M, Onofre ASC, Gabbert HE, Kappes R, Gerharz CD, Grote HJ. Methylation assay for the diagnosis of lung cancer on bronchial aspirates: a cohort study. *Clin Cancer Res.* 2005;11(21):7728–34.
- Scholz C, Nimmrich I, Burger M, Becker E, Dörken B, Ludwig WD, Maier S. Distinction of acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia through microarray-based DNA methylation analysis. *Ann Hematol.* 2005;84(4):236–44.
- Seng TJ, Currey N, Cooper WA, Lee CS, Chan C, Horvath L, Sutherland RL, Kennedy C, McCaughan B, Kohonen-Corish MRJ. DLEC1 and MLH1 promoter methylation are associated with poor prognosis in non-small cell lung carcinoma. *Br J Cancer.* 2008;99(2):375–82.
- Seto M, Ohta M, Ikenoue T, Sugimoto T, Asaoka Y, Tada M, Mohri D, Kudo Y, Ijichi H, Tateishi K, Otsuka M, Hirata Y, Maeda S, Koike K, Omata M. Reduced expression of RAS protein activator like-1 in gastric cancer. *Int J Cancer.* 2011;128(6):1293–302.
- Sharp AJ, Stathaki E, Migliavacca E, Brahmachary M, Montgomery SB, Dupre Y, Antonarakis SE. DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes. *Genome Res.* 2011;21(10):1592–600.
- Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, Solomon B, Stubbs H, Admane S, McDermott U, Settleman J, Kobayashi S, Mark EJ, Rodig SJ, Chirieac LR, Kwak EL, Lynch TJ, Iafrate AJ. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol.* 2009;27(26):4247–53.
- Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, Martin C, O'Leary JJ, Ruan Q, Johnson DS, Chen Y, O'Neill LAJ. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol.* 2010;11(2):141–7.
- Shi N, Tian C, Liang X, Jiang P, Liang L, Zhou L, Shu Y, Chen P, Wang Y. Proteome analysis of actin filament-associated proteins in the postnatal rat cerebellum. *Neuroscience.* 2012;227:90–101.
- Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Feng Z, Roth JA, Herz J, Minna JD, Gazdar AF. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2005b;97(5):339–46.
- Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M, Majmudar K, Suzuki M, Lee H, Wistuba II, Fong KM, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Minna JD, Gazdar AF. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res.* 2005a;65(5):1642–6.
- Shinjo K, Okamoto Y, An B, Yokoyama T, Takeuchi I, Fujii M, Osada H, Usami N, Hasegawa Y, Ito H, Hida T, Fujimoto N, Kishimoto T, Sekido Y, Kondo Y. Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations reveals CpG island methylator phenotype associated with distinct clinical characters of lung adenocarcinoma. *Carcinogenesis.* 2012;33(7):1277–85.
- Shiota M, Izumi H, Tanimoto A, Takahashi M, Miyamoto N, Kashiwagi E, Kidani A, Hirano G, Masubuchi D, Fukunaka Y, Yasuniwa Y, Naito S, Nishizawa S, Sasaguri Y, Kohno K. Programmed cell death protein 4 down-regulates Y-box binding protein-1 expression via a direct interaction with Twist1 to suppress cancer cell growth. *Cancer Res.* 2009;69(7):3148–56.

- Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, White MA. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol Cell Biol*. 2002;22(12):4309–18.
- Shivapurkar N, Stastny V, Suzuki M, Wistuba II, Li L, Zheng Y, Feng Z, Hol B, Prinsen C, Thunnissen FB, Gazdar AF. Application of a methylation gene panel by quantitative PCR for lung cancers. *Cancer Lett*. 2007;247(1):56–71.
- Smith-Sørensen B, Lind GE, Skotheim RI, Fosså SD, Fodstad Ø, Stenwig AE, Jakobsen KS, Lothe RA. Frequent promoter hypermethylation of the O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) gene in testicular cancer. *Oncogene*. 2002;21(57):8878–84.
- Soejima H, Miyoshi O, Yoshinaga H, Masaki Z, Ozaki I, Kajiwara S, Niikawa N, Matsushashi S, Mukai T. Assignment of the programmed cell death 4 gene (PDCD4) to human chromosome band 10q24 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 1999;87(1-2):113–4.
- Soengas MS, Capodiceci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardó C, Lowe SW. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*. 2001;409(6817):207–11.
- Somasundaram A, Socinski MA, Burns TF. Personalized treatment of EGFR mutant and ALK-positive patients in NSCLC. *Expert Opin Pharmacother*. 2014;15(18):2693–708.
- Song MS, Song SJ, Ayad NG, Chang JS, Lee JH, Hong HK, Lee H, Choi N, Kim J, Kim H, Kim JW, Choi EJ, Kirschner MW, Lim DS. The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex. *Nat Cell Biol*. 2004;6(2):129–37.
- Sot B, Behrmann E, Raunser S, Wittinghofer A. Ras GTPase activating (RasGAP) activity of the dual specificity GAP protein Rasal requires colocalization and C2 domain binding to lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(1):111–6.
- Suehiro Y, Wong CW, Chirieac LR, Kondo Y, Shen L, Webb CR, Chan YW, Chan ASY, Chan TL, Wu TT, Rashid A, Hamanaka Y, Hinoda Y, Shannon RL, Wang X, Morris J, Issa JPI, Yuen ST, Leung SY, Hamilton SR. Epigenetic-genetic interactions in the APC/WNT, RAS/RAF, and P53 pathways in colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(9):2560–9.
- Suzuki C, Garces RG, Edmonds KA, Hiller S, Hyberts SG, Marintchev A, Wagner G. PDCD4 inhibits translation initiation by binding to eIF4A using both its MA3 domains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(9):3274–9.
- Suzuki H, Takahashi T, Kuroishi T, Suyama M, Ariyoshi Y, Takahashi T, Ueda R. p53 mutations in non-small cell lung cancer in Japan: association between mutations and smoking. *Cancer Res*. 1992;52(3):734–6.
- Suzuki M, Shigematsu H, Iizasa T, Hiroshima K, Nakatani Y, Minna JD, Gazdar AF, Fujisawa T. Exclusive mutation in epidermal growth factor receptor gene, HER-2, and KRAS, and synchronous methylation of nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2006;106(10):2200–7.
- Tahara T, Maegawa S, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Estécio MRH, Shibata T, Hirata I, Arisawa T, Issa JPI. Examination of whole blood DNA methylation as a potential risk marker for gastric cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2013;6(10):1093–100.
- Tang HL, Deng M, Liao QJ, Zeng X, Zhou XT, Su Q. [Expression and clinical significance of miR-23a and metastasis suppressor 1 in colon carcinoma]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2012;41(1):28–32. Chinese.
- Tano K, Shiota S, Collier J, Foote RS, Mitra S. Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O<sup>6</sup>-alkylguanine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87(2):686–90.
- Tao H, Huang C, Yang JJ, Ma TT, Bian EB, Zhang L, Lv XW, Jin Y, Li J. MeCP2 controls the expression of RASAL1 in the hepatic fibrosis in rats. *Toxicology*. 2011;290(2-3):327–33.

- Tessema M, Yingling CM, Liu Y, Tellez CS, van Neste L, Baylin SS, Belinsky SA. Genome-wide unmasking of epigenetically silenced genes in lung adenocarcinoma from smokers and never smokers. *Carcinogenesis*. 2014;35(6):1248–57.
- Tessema M, Yu YY, Stidley CA, Machida EO, Schuebel KE, Baylin SB, Belinsky SA. Concomitant promoter methylation of multiple genes in lung adenocarcinomas from current, former and never smokers. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1132–8.
- Thaler S, Hähnel PS, Schad A, Dammann R, Schuler M. RASSF1A mediates p21<sup>Cip1/Waf1</sup>-dependent cell cycle arrest and senescence through modulation of the Raf-MEK-ERK pathway and inhibition of Akt. *Cancer Res*. 2009;69(5):1748–57.
- Thiberville L, Payne P, Vielkinds J, LeRiche J, Horsman D, Nouvet G, Palcic B, Lam S. Evidence of cumulative gene losses with progression of premalignant epithelial lesions to carcinoma of the bronchus. *Cancer Res*. 1995;55(22):5133–9.
- Toh CK, Gao F, Lim WT, Leong SS, Fong KW, Yap SP, Hsu AAL, Eng P, Koong HN, Thirugnanam A, Tan EH. Never-smokers with lung cancer: epidemiologic evidence of a distinct disease entity. *J Clin Oncol*. 2006;24(15):2245–51.
- Tomizawa Y, Iijima H, Nomoto T, Iwasaki Y, Otani Y, Tsuchiya S, Saito R, Dobashi K, Nakajima T, Mori M. Clinicopathological significance of aberrant methylation of RAR $\beta$ 2 at 3p24, RASSF1A at 3p21.3, and FHIT at 3p14.2 in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2004;46(3):305–12.
- Topaloglu O, Hoque MO, Tokumaru Y, Lee J, Ratovitski E, Sidransky D, Moon CS. Detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor and bronchoalveolar lavage of patients with lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10(7):2284–8.
- Toyooka S, Maruyama R, Toyooka KO, McLerran D, Feng Z, Fukuyama Y, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, Tsukuda K, Sugio K, Shimizu N, Shimizu K, Lee H, Chen C, Fong KM, Gilcrease M, Roth JA, Minna JD, Gazdar AF. Smoke exposure, histologic type and geography-related differences in the methylation profiles of non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2003;103(2):153–60.
- Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JPI. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(15):8681–6.
- Travis WD; Brambilla E; Müller-Hermelink HK; Harris CC, editors. *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. Lyon (France): IARC Press; 2004. 344 p. (World Health Organization Classification of Tumours; 7).
- Ulbrich C, Pietsch J, Grosse J, Wehland M, Schulz H, Saar K, Hübner N, Hauslage J, Hemmersbach R, Braun M, van Loon J, Vagt N, Egli M, Richter P, Einspanier R, Sharbati S, Baltz T, Infanger M, Ma X, Grimm D. Differential gene regulation under altered gravity conditions in follicular thyroid cancer cells: relationship between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Cell Physiol Biochem*. 2011;28(2):185–98.
- Ullman TA, Itzkowitz SH. Intestinal Inflammation and Cancer. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1807–1816.
- Utikal J, Gratchev A, Muller-Molinet I, Oerther S, Kzhyshkowska J, Arens N, Grobholz R, Kannookadan S, Goerdts S. The expression of metastasis suppressor MIM/MTSS1 is regulated by DNA methylation. *Int J Cancer*. 2006;119(10):2287–93.
- Vaissière T, Hung RJ, Zaridze D, Moukeria A, Cuenin C, Fasolo V, Ferro G, Paliwal A, Hainaut P, Brennan P, Tost J, Boffetta P, Herceg Z. Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. *Cancer Res*. 2009;69(1):243–52.
- van der Drift MA, Prinsen CFM, Knuiman GJ, Janssen JP, Dekhuijzen PNR, Thunnissen FBJM. Diagnosing peripheral lung cancer: the additional value of the Ras-association domain family 1A

- gene methylation and Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog mutation analyses in washings in nondiagnostic bronchoscopy. *Chest*. 2011;141(1):169–75.
- van Duin M, van Marion R, Vissers KJ, Hop WCJ, Dinjens WNM, Tilanus HW, Siersema PD, van Dekken H. High-resolution array comparative genomic hybridization of chromosome 8q: evaluation of putative progression markers for gastroesophageal junction adenocarcinomas. *Cytogenet Genome Res*. 2007;118(2-4):130–7.
- Vaňhara P, Horak P, Pils D, Anees M, Petz M, Gregor W, Zeillinger R, Krainer M. Loss of the oligosaccharyl transferase subunit TUSC3 promotes proliferation and migration of ovarian cancer cells. *Int J Oncol*. 2013;42(4):1383–9.
- Verger E, Gil M, Yaya R, Viñolas N, Villà S, Pujol T, Quintó L, Graus F. Temozolomide and concomitant whole brain radiotherapy in patients with brain metastases: a phase II randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005;61(1):185–91.
- Virmani AK, Fong KM, Kodagoda D, McIntire D, Hung J, Tonk V, Minna JD, Gazdar AF. Allelotyping demonstrates common and distinct patterns of chromosomal loss in human lung cancer types. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998;21(4):308–19.
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(7):2257–61.
- Walker SA, Kupzig S, Bouyoucef D, Davies LC, Tsuboi T, Bivona TG, Cozier GE, Lockyer PJ, Buckler A, Rutter GA, Allen MJ, Philips MR, Cullen PJ. Identification of a Ras GTPase-activating protein regulated by receptor-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. *EMBO J*. 2004;23(8):1749–60.
- Wang D, Xu MR, Wang T, Li T, Zhu JW. MTSS1 overexpression correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *J Gastrointest Surg*. 2011;15(7):1205–12.
- Wang J, Li J, Shen J, Wang C, Yang L, Zhang X. MicroRNA-182 downregulates metastasis suppressor 1 and contributes to metastasis of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2012;12:227.
- Wang Q, Sun Z, Yang HS. Downregulation of tumor suppressor Pcd4 promotes invasion and activates both  $\beta$ -catenin/Tcf and AP-1-dependent transcription in colon carcinoma cells. *Oncogene*. 2008;27(11):1527–35.
- Wang T, Zhang L, Shi C, Sun H, Wang J, Li R, Zou Z, Ran X, Su Y. TGF- $\beta$ -induced miR-21 negatively regulates the antiproliferative activity but has no effect on EMT of TGF- $\beta$  in HaCaT cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(2):366–76.
- Wang Y, Ding L, Zhang X, Zhao M, Qu Z, Huang S, Zhang Y, Li Y, Gao F. Clinical significance of programmed cell death 4 expression in malignant progression of human nasal inverted papillomas. *Med Oncol*. 2012;29(4):2505–11.
- Wang Y, Liu J, Smith E, Zhou K, Liao J, Yang GY, Tan M, Zhan X. Downregulation of missing in metastasis gene (MIM) is associated with the progression of bladder transitional carcinomas. *Cancer Invest*. 2007a;25(2):79–86.
- Wang Y, Zhou K, Zeng X, Lin J, Zhan X. Tyrosine phosphorylation of missing in metastasis protein is implicated in platelet-derived growth factor-mediated cell shape changes. *J Biol Chem*. 2007b;282(10):7624–31.
- Warnecke PM, Stirzaker C, Song J, Grunau C, Melki JR, Clark SJ. Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods*. 2002;27(2):101–7.
- Watts GS, Pieper RO, Costello JF, Peng YM, Dalton WS, Futscher BW. Methylation of discrete regions of the O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene. *Mol Cell Biol*. 1997;17(9):5612–9.

- Wei NA, Liu SS, Leung THY, Tam KF, Liao XY, Cheung ANY, Chan KKL, Ngan HYS. Loss of Programmed cell death 4 (Pdc4) associates with the progression of ovarian cancer. *Mol Cancer*. 2009;8:70.
- Wen YH, Shi X, Chiriboga L, Matsahashi S, Yee H, Afonja O. Alterations in the expression of PDCD4 in ductal carcinoma of the breast. *Oncol Rep*. 2007;18(6):1387–93.
- Wistuba II, Behrens C, Milchgrub S, Bryant D, Hung J, Minna JD, Gazdar AF. Sequential molecular abnormalities are involved in the multistage development of squamous cell lung carcinoma. *Oncogene*. 1999a;18(3):643–50.
- Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Mele G, Milchgrub S, Girard L, Fondon JW, Garner HR, McKay B, Latif F, Lerman MI, Lam S, Gazdar AF, Minna JD. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Res*. 2000a;60(7):1949–60.
- Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Milchgrub S, Syed S, Lam S, Mackay B, Minna JD, Gazdar AF. Allelic losses at chromosome 8p21-23 are early and frequent events in the pathogenesis of lung cancer. *Cancer Res*. 1999b;59(8):1973–9.
- Wistuba II, Berry J, Behrens C, Maitra A, Shivapurkar N, Milchgrub S, Mackay B, Minna JD, Gazdar AF. Molecular changes in the bronchial epithelium of patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2000b;6(7):2604–10.
- Wistuba II, Lam S, Behrens C, Virmani AK, Fong KM, LeRiche J, Samet JM, Srivastava S, Minna JD, Gazdar AF. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(18):1366–73.
- Wittekind C; Meyer H, editors. *TNM - Klassifikation maligner Tumoren [TNM classification of malignant tumours]*. 7th ed. Weinheim, Germany: Wiley-Blackwell; 2010. 315 p. German.
- Woenckhaus M, Klein-Hitpass L, Grepmeier U, Merk J, Pfeifer M, Wild PJ, Bettstetter M, Wuensch P, Blaszyk H, Hartmann A, Hofstaedter F, Dietmaier W. Smoking and cancer-related gene expression in bronchial epithelium and non-small-cell lung cancers. *J Pathol*. 2006;210(2):192–204.
- Wright K, Wilson PJ, Kerr J, Do K, Hurst T, Khoo SK, Ward B, Chenevix-Trench G. Frequent loss of heterozygosity and three critical regions on the short arm of chromosome 8 in ovarian adenocarcinomas. *Oncogene*. 1998;17(9):1185–8.
- Wu JY, Wang J, Lai JC, Cheng YW, Yeh KT, Wu TC, Chen CY, Lee H. Association of O<sub>6</sub>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation with p53 mutation occurrence in non-small cell lung cancer with different histology, gender, and smoking status. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(11):3272–7.
- Wu PF, Kuo KT, Kuo LT, Lin YT, Lee WC, Lu YS, Yang CH, Wu RM, Tu YK, Tasi JC, Tseng HM, Tseng SH, Cheng AL, Lin CH. O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA methyltransferase expression and prognostic value in brain metastases of lung cancers. *Lung Cancer*. 2010;68(3):484–90.
- Xie F, Ye L, Chen J, Wu N, Zhang Z, Yang Y, Zhang L, Jiang WG. The impact of Metastasis Suppressor-1, MTSS1, on oesophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance. *J Transl Med*. 2011;9:95.
- Xu B, Di J, Wang Z, Han X, Li Z, Luo X, Zheng Q. Quantitative analysis of RASSF1A promoter methylation in hepatocellular carcinoma and its prognostic implications. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;438(2):324–8.
- Xu XL, Yu J, Zhang HY, Sun MH, Gu J, Du X, Shi DR, Wang P, Yang ZH, Zhu JD. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2004;10(23):3441–54.



- Yamashita S, Tsujino Y, Moriguchi K, Tatematsu M, Ushijima T. Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. *Cancer Sci.* 2006;97(1):64–71.
- Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, Kanauchi N, Endoh M, Sadahiro M, Motoyama T. Promoter hypermethylation of RASSF1A and RUNX3 genes as an independent prognostic prediction marker in surgically resected non-small cell lung cancers. *Lung Cancer.* 2007;58(1):131–8.
- Yang HS, Cho MH, Zakowicz H, Hegamyer G, Sonenberg N, Colburn NH. A novel function of the MA-3 domains in transformation and translation suppressor Pdc4 is essential for its binding to eukaryotic translation initiation factor 4A. *Mol Cell Biol.* 2004;24(9):3894–906.
- Yang HS, Jansen AP, Komar AA, Zheng X, Merrick WC, Costes S, Lockett SJ, Sonenberg N, Colburn NH. The transformation suppressor Pdc4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. *Mol Cell Biol.* 2003b;23(1):26–37.
- Yang HS, Jansen AP, Nair R, Shibahara K, Verma AK, Cmarik JL, Colburn NH. A novel transformation suppressor, Pdc4, inhibits AP-1 transactivation but not NF- $\kappa$ B or ODC transactivation. *Oncogene.* 2001;20(6):669–76.
- Yang HS, Knies JL, Stark C, Colburn NH. Pdc4 suppresses tumor phenotype in JB6 cells by inhibiting AP-1 transactivation. *Oncogene.* 2003a;22(24):3712–20.
- Yang HS, Matthews CP, Clair T, Wang Q, Baker AR, Li CCH, Tan TH, Colburn NH. Tumorigenesis suppressor Pdc4 down-regulates mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 expression to suppress colon carcinoma cell invasion. *Mol Cell Biol.* 2006;26(4):1297–306.
- Yang J, Shen Y, Liu B, Tong Y. Promoter methylation of BRMS1 correlates with smoking history and poor survival in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2011;74(2):305–9.
- Yao Q, Cao S, Li C, Mengesha A, Kong B, Wei M. Micro-RNA-21 regulates TGF- $\beta$ -induced myofibroblast differentiation by targeting PDCD4 in tumor-stroma interaction. *Int J Cancer.* 2011;128(8):1783–92.
- Yasuda M, Schmid T, Rübsamen D, Colburn NH, Irie K, Murakami A. Downregulation of programmed cell death 4 by inflammatory conditions contributes to the generation of the tumor promoting microenvironment. *Mol Carcinog.* 2010;49(9):837–48.
- Yoon JH, Dammann R, Pfeifer GP. Hypermethylation of the CpG island of the RASSF1A gene in ovarian and renal cell carcinomas. *Int J Cancer.* 2001;94(2):212–7.
- Yu D, Zhan XH, Niu S, Mikhailenko I, Strickland DK, Zhu J, Cao M, Zhan X. Murine missing in metastasis (MIM) mediates cell polarity and regulates the motility response to growth factors. *PLoS ONE.* 2011;6(6):e20845.
- Yu D, Zhan XH, Zhao XF, Williams MS, Carey GB, Smith E, Scott D, Zhu J, Guo Y, Cherukuri S, Civin CI, Zhan X. Mice deficient in MIM expression are predisposed to lymphomagenesis. *Oncogene.* 2012;31(30):3561–8.
- Yu J, Ma X, Cheung KF, Li X, Tian L, Wang S, Wu CW, Wu WKK, He M, Wang M, Ng SSM, Sung JJY. Epigenetic inactivation of T-box transcription factor 5, a novel tumor suppressor gene, is associated with colon cancer. *Oncogene.* 2010;29(49):6464–74.
- Zemlyakova VV, Zhevlova AI, Strelnikov VV, Lyubchenko LN, Schabanov MA, Vishnevskaya YV, Tretyakova VA, Zaletayev DV, Nemtsova MV. [Abnormal methylation of several tumor suppressor genes in sporadic breast cancer]. *Molekulyarnaya Biologiya.* 2003a;37(4):696–703. Russian. Englische Version unter: *Mol Biol.* 2003a;37(4):591–7.
- Zemlyakova VV, Zhevlova AI, Zborovskaya IB, Strelnikov VV, Laktionov KK, Zaletaev DV, Nemtsova MV. [Methylation profile of several tumor suppressor genes in non-small-cell lung cancer]. *Molekulyarnaya Biologiya.* 2003b;37(6): 983–988 Englische Version unter: *Mol Biol.* 2003b;37(6):836–40.

- Zeng Y, Cullen BR. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA*. 2003;9(1):112–23.
- Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell*. 2002;9(6):1327–33.
- Zhang H, Ozaki I, Mizuta T, Hamajima H, Yasutake T, Eguchi Y, Ideguchi H, Yamamoto K, Matsuhashi S. Involvement of programmed cell death 4 in transforming growth factor- $\beta$ 1-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2006;25(45):6101–12.
- Zhang S, Li J, Jiang Y, Xu Y, Qin C. Programmed cell death 4 (PDCD4) suppresses metastatic potential of human hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2009;28:71.
- Zhao W, Han HB, Zhang ZQ. Suppression of lung cancer cell invasion and metastasis by connexin43 involves the secretion of follistatin-like 1 mediated via histone acetylation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43(10):1459–68.
- Zhou H, Clapham DE. Mammalian MagT1 and TUSC3 are required for cellular magnesium uptake and vertebrate embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(37):15750–5.
- Zhou W, Li X, Liu F, Xiao Z, He M, Shen S, Liu S. MiR-135a promotes growth and invasion of colorectal cancer via metastasis suppressor 1 in vitro. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2012;44(10):838–46.
- Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res*. 2008;18(3):350–9.
- Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res*. 2001;61(1):249–55.

## **11 Eigene Publikation**

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise in der Zeitschrift Oncology Letters veröffentlicht:

Duppel U, Woenckhaus M, Schulz C, Merk J, Dietmaier W. Quantitative detection of TUSC3 promoter methylation – a potential biomarker for prognosis in lung cancer. Oncol Lett. 2016;12(4):3004–12.

## 12 Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich ganz herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen beiden Doktorvätern und Betreuern Herrn Prof. Dr. Wolfgang Dietmaier und Herrn PD Dr. Matthias Woenckhaus für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Mittel sowie die intensive Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und dem Verfassen dieser Arbeit. Insbesondere danke ich ihnen für ihre Geduld, die Akzeptanz meiner Hartnäckigkeit, ihre ermunternden und ermutigenden Worte und das in mich gesetzte Vertrauen. Herrn Prof. Dr. Christian Schulz sei herzlich dafür gedankt, dass er die Aufgabe des Zweitgutachters übernommen hat.

Des Weiteren möchte ich Frau Dr. Corinna Lang-Schwarz und Frau Dr. Katharina Schardt für die Hilfestellung bei der Identifizierung der verschiedenen Gewebsentitäten auf histopathologischen Schnitten sowie der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klein für die Überlassung des LightCycler® 480 für die Analysen am Gen TUSC3 danken.

Vielen Dank auch dem Team des Zentrums für Molekularpathologische Diagnostik, das mich von Anfang an herzlich aufgenommen hat und mir damit die vielen Stunden im Labor verkürzte. Insbesondere danke ich Irene, Jutta, Sigi, Natalie, Beate und Ben, die mich in die molekularpathologischen Arbeitstechniken einführten, mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und mir auf der einen oder anderen Durststrecke Mut zusprachen.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die mich während meines Studiums und im Rahmen dieser Arbeit unermüdlich unterstützten, immer ein offenes Ohr für mich haben und dadurch jederzeit zur Verwirklichung meiner Pläne und Ziele beitragen.

Nicht zuletzt danke ich meinem Ehemann Hartmut für seine unendliche Geduld und Unterstützung.

## 13 Erklärung

Ich erkläre,

- dass ich den Doktorgrad der Medizin nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe
- dass ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des medizinischen Doktorgrades zugelassen bin
- dass ich die medizinische Doktorprüfung nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland endgültig nicht bestanden habe

Außerdem erkläre ich,

- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen
- dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.